Univerzitet u Nišu
Prirodno-matematički fakultet
Departman hemija

mr Aleksandar M. Veselinović

Uticaj dijamagnetnih dvovalentnih jona metala na autooksidaciju vicinalnih trihidroksilnih fenolnih jedinjenja u vodenim rastvorima

Doktorska disertacija

Niš, 2014.

University of Niš
Faculty of Natural Sciences and Mathematics
Department of Chemistry

mr Aleksandar M. Veselinović

The influence of divalent diamagnetic metal ions on vicinal trihydroxy phenolic compounds autoxidation in aqueous solutions

Doctoral Dissertation

Niš, 2014.

Mentor:

Dr Goran M. Nikolić, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

Članovi komisije:

1. Dr Ružica S. Nikolić, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu
2. Dr Danijela A. Kostić, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu
3. Dr Vesna D. Nikolić, redovni profesor Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Nišu
4. Dr Jelena V. Živković, docent Medicniskog fakulteta Univerziteta u Nišu

Прилог 4/1

ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, **РБР**:	
Идентификациони број, **ИБР**:	
Тип документације, **ТД**:	монографска
Тип записа, **ТЗ**:	текстуални / графички
Врста рада, **ВР**:	докторска дисертација
Аутор, **АУ**:	Александар М. Веселиновић
Ментор, **МН**:	Горан М. Николић
Наслов рада, **НР**:	Утицај дијамагнетних двовалентних јона метала на аутооксидацију вициналних трихидроксилних фенолних једињења у воденим растворима
Језик публикације, **ЈП**:	српски
Језик извода, **ЈИ**:	енглески
Земља публиковања, **ЗП**:	Србија
Уже географско подручје, **УГП**:	Србија
Година, **ГО**:	2013.
Издавач, **ИЗ**:	ауторски репринт
Место и адреса, **МА**:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, **ФО**: (поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)	7 поглавља, 168 страна, 133 цитата, 16 табела, 88 слика
Научна област, **НО**:	Хемија
Научна дисциплина, **НД**:	Физичка хемија
Предметна одредница/Кључне речи, **ПО**:	аутооксидација, пирогалол, гална киселина, етил-галат, дијамагнетни метални јони
УДК	546.4:542.943-92:547.565(043.3)
Чува се, **ЧУ**:	библиотека
Важна напомена, **ВН**:	Истраживања су финансирана од стране Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије, у оквиру пројекта ОИ172044: „Добијање, физичко-хемијска карактеризација, аналитика и биолошка активност фармаколошки активних супстанци“.

Извод, **ИЗ**:	У овој дисертацији испитиван је утицај дијамагнетних металних јона (Mg(II), Ca(II), Sr(II), Ba(II), Zn(II), Cd(II) и Pb(II)) на аутооксидацију вициналних трихидроксилних фенолних једњења у воденим растворима. Процеси аутооксидације пирогалола (најједноставније једињење са одговарајућом структуром), галне киселине и етил-галата проучавани су применом UV/Vis спектофотометрије са накнадном хемометријском обрадом података, ESR спектроскопије, течне хроматографије високог учинка (HPLC) и масене спектрометрије (ESI-MS). Утврђено је да pH вредност раствора и присуство и врста дијамагнетних металних јона имају велики утицај на брзину и начин одвијања процеса аутооксидације испитиваних једињења. Помоћу примењених техника одређена је структура прелазних слободно радикалских врста и стабилних производа аутооксидације. Добијени резултати омогућавају боље разумевање механизама процеса аутооксидације испитиваних једињења што је посебно значајно јер се гална киселина налази у многим биљкама које показују изражено фармаколошко деловање, док се етил-галат користи као антиоксидант у прехрамбеним производима.
Датум прихватања теме, **ДП**:	24.09.2012.
Датум одбране, **ДО**:	
Чланови комисије, **КО**: Председник:	
Члан:	
Члан:	
Члан:	
Члан, ментор:	

Прилог 4/2

ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, **ANO**:	
Identification number, **INO**:	
Document type, **DT**:	monograph
Type of record, **TR**:	textual / graphic
Contents code, **CC**:	doctoral dissertation
Author, **AU**:	Aleksandar M. Veselinović
Mentor, **MN**:	Goran M. Nikolić
Title, **TI**:	The influence of divalent diamagnetic metal ions on vicinal trihydroxy phenolic compounds autoxidation in aqueous solutions
Language of text, **LT**:	Serbian
Language of abstract, **LA**:	English
Country of publication, **CP**:	Serbia
Locality of publication, **LP**:	Serbia
Publication year, **PY**:	2013
Publisher, **PB**:	author's reprint
Publication place, **PP**:	Niš, Višegradska 33.
Physical description, **PD**: (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	7 chapters, 168 pages, 133 references, 16 tables, 88 pictures
Scientific field, **SF**:	Chemistry
Scientific discipline, **SD**:	Physical chemistry
Subject/Key words, **S/KW**:	autoxidation, pyrogallol, gallic acid, ethyl-gallate, diamagnetic metal ions
UC	546.4:542.943-92:547.565(043.3)
Holding data, **HD**:	library
Note, **N**:	Research was funded by the Ministry of Science and Technological Development of Serbia, in the scope of development project OI172044 entitled: "Obtaining, physicochemical characterization, analysis and biological activity of pharmacologically active compounds"

Abstract, **AB**:		In this dissertation the influence of divalent diamagnetic metal ions (Mg(II), Ca(II), Sr(II), Ba(II), Zn(II), Cd(II) and Pb(II)) on vicinal trihydroxy phenolic compounds autoxidation in aqueous solutions was examined. Autoxidation processes of pyrogallol (the simplest compound with appropriate structure), gallic acid and ethyl gallate were studied with the application of UV/Vis spectrophotometry with chemometric data processing, EPR spectroscopy, High-performance liquid chromatography (HPLC) and Mass spectrometry (ESI-MS). It was determined that pH value of solution and presence and type of diamagentic metal ions have great influence on investigated compounds autoxidation processes rates and mechanism. With the aid of applied techniques the structures of transition free radical species and stable autoxidation processes products were determined. Obtained results enabled better understanding of investigated compounds autoxidation processes which is of great importance since gallic acid is found in many plants, while ethyl gallate is used as an antioxidant in food.
Accepted by the Scientific Board on, **ASB**:		24.09.2012.
Defended on, **DE**:		
Defended Board, **DB**:	President:	
	Member:	
	Member:	
	Member:	
	Member, Mentor:	

Eksperimentalni deo ove doktorske disertacije urađen je u laboratorijama Odeska za farmaciju Medicinskog fakulteta u Nišu u okviru istraživanja vezanih za projekat Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije, evidencioni broj 172044. Zahvaljujem se zaposlenima u ovoj instituciji na pruženoj pomoći.

Mentoru, prof. dr Goranu Nikoliću, redovnom profesoru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, najtoplije se zahvaljujem na predloženoj temi disertacije, nesebičnom angažovanju na izradi disertacije, na savetima koji su doprineli kvalitetu ovog rada, kao i na divnoj saradnji i razumevanju.

Prof. dr Ružici Nikolić, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, zahvaljujem na stručnoj i tehničkoj pomoći i na savetima koje mi je pružla tokom rada na disertaciji.

Zahvaljujem se prof. dr Danijeli Kostić, redovnom profesoru Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu, prof. dr Vesni Nikolić, redovnom profesoru Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Nišu i dr Jeleni Živković, docentu Medicinskog fakuleta Univerziteta u Nišu na korisnim sugestijama u završnoj fazi rada i što su se rado prihvatile ocene ovo grada.

Zahvaljujem se i svim članovima moje porodice za bezbroj puta pruženu pomoć, podršku i razumevanje.

Sadržaj

1. Uvod..... 1
2. Opšti deo..... 6
2.1. Oksidativni procesi i slobodni radikali……..……..... 7
2.1.1. Antioksidansi……... 12
2.1.2. Autooksidacija vicinalnih polihidroksilnih fenola...……13
2.2. Dijamagnetni joni metala i njihov biološki značaj……..…….…….. 18
2.2.1. Zemnoalkali metali…….. 19
2.2.1.1. Magnezijum…….. 20
2.2.1.2. Kalcijum……21
2.2.1.3. Stroncijum……24
2.2.1.4. Barijum……. 25
2.2.2. Cink……..26
2.2.3. Olovo……... 28
2.2.4. Kadmijum…… 29
2.3. Uticaj dvovalentnih dijamagnetnih jona na autooksidaciju fenolnih jedinjenja. 30
2.4. Metode i tehnike ispitivanja procesa autooksidacije…….. 33
2.4.1. UV/Vis spektrofotometrija…….. 33
2.4.1.1.Grafička metoda za određivanje broja čestica u rastvoru korišćenjem spektrofotometrijskih podataka…….……... 34
2.4.1.2. MCR-ALS……..…….. 37
2.4.2. Elektron spin rezonantna spektroskopija……46
2.4.3. Tečna hromatografija visokih performansi……..49
2.4.4. Elektron-sprej jonizaciona – masena spektrometrija (ESI-MS)…….. 50
3. Eksperimentalni deo……...…….. 52
3.1. Supstance korišćene za eksperimentalni rad…….. 53
3.2. Modelovanje sistema za UV/Vis spektrofotometriju ……..... 53
3.3. Hemometrijska i statistička obrada podataka dobijenih UV/Vis spektrofotometrijom…….. 55
3.4. Modelovanje sistema za ESR spektroskopiju.……57
3.5. Modelovanje sistema za HPLC-DAD/FL i analizu…… 57

3.6. Modelovanje sistema za ESI-MS analizu…….…….. 57
4. Rezultati i diskusija……59
4.1. Pirogalol……..60
4.1.1. Autooksidacija pirogalola u slabo baznim vodenim rastvorima…….……... 60
4.1.1.1. UV/Vis spektralna analiza……..……..... 60
4.1.1.2. HPLC-DAD i HPLC-FL analiza…….. 71
4.1.1.3. ESI-MS analiza……73
4.1.2. Autooksidacija pirogalola u prisustvu dvovalentnih jona zemnoalkalnih metala……76
4.1.2.1. UV/Vis spektralna analiza…….……... 76
4.1.2.2. ESR analiza ……. 83
4.1.2.3. HPLC-DAD i HPLC-FL analiza…….. 87
4.1.3. Autooksidacija pirogalola u prisustvu Zn(II) jona……...89
4.1.3.1. UV/Vis spektralna analiza…….……... 89
4.1.3.2. ESR analiza……...94
4.1.4. Autooksidacija pirogalola u prisustvu Pb(II) i Cd(II) jona……. 95
4.1.4.1. UV/Vis spektralna analiza…….……... 95
4.2. Galna kiselina……..98
4.2.1. Autooksidacija galne kiseline u baznim vodenim rastvorima……..... 98
4.2.1.1. UV/Vis spektralna analiza……... 98
4.2.1.2. HPLC-DAD ispitivanje autooksidacije galne kiseline u baznim vodenim rastvorima…….. 104
4.2.1.3. ESI-MS analiza……107
4.2.2. Autooksidacija galne kiseline u prisustvu dvovalentnih dijamagnetnih jona zemnoalkalnih metala…… 109
4.2.2.1. UV/Vis spektralna analiza…….……... 109
4.2.2.2. ESR analiza ……. 116
4.2.2.3. HPLC-DAD ispitivanje uticaja Mg(II) jona na proces autooksidacije galne kiseline u baznim vodenim rastvorima…….. 119
4.2.3. Autooksidacija galne kiseline u prisustvu Zn(II), Pb(II) i Cd(II) jona…… 121
4.3. Etil-galat……. 122
4.3.1. Autooksidacija etil-galata u slabo baznim vodenim rastvorima ……..... 122
4.3.1.1. UV/Vis spektralna analiza…….……... 122
4.3.1.2. ESI-MS analiza……129

4.3.2. Autooksidacija etil-galata u prisustvu dvovalentnih dijamagnetnih jona zemnoalkalnih metala…… 131
4.3.2.1. UV/Vis spektralna analiza……..……..……..... 131
4.3.3. Autooksidacija etil-galata u prisustvu Zn(II), Pb(II) i Cd(II) jona……. 137
5. Zaključak……139
6. Summary……145
5. Literatura……151
Biografija sa bibliografijom……...164

Skraćenice korišćene u tezi

Skraćenica	Značenje
A	Apsorbancija
ATP	Adenozin trifosfat
DAD	Diode array detector
DIMS	Tehnika direktne infuzije
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
EA	Elaginska kiselina
EFA	Evolving Factor Analysis
EG	Etil-galat
EPR	Elektron paramagnetna rezonanca
ESI-MS	Elektron-sprej jonizaciona – masena spektrometrija
ESR	Elektronska spinska rezonanca
FA	Factor Analysis
FL	Fluorescentni detektor
GA	Galna kiselina
HOMO	Najviša popunjena molekulska orbitala
HPLC	Tečna hromatografija visokih performansi
LOF	Lack-of-fit
LUMO	Najniža nepopunjena molekulska orbitala
MCR-ALS	Multivariate curve resolution-alternating least squares
p.a.	Za analizu (pro analysi)
PCA	Principal Component Analysis
PG	Pirogalol
ppm	Delovi na milion (parts per million)
QQ	Hinonski molekul
R	Rang matrice
r^2	Procenat objašnjene varijance na optimumu
RoHS	Restriction on Hazardous Substances
ROS	Reaktivne kiseonične vrste
RT	Retenciono vreme
RV	Retenciona zapremina
SdRex	Standardna devijacija ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke
SQ	Semihinonski radikal
SVD	Singular value decomposition
UV/Vis	Ultraljubičasta-vidljiva spektrofotometrija

1. Uvod

Fenolna jedinjenja predstavljaju klasu jedinjenja koja su široko rasprostranjena u prirodi i imaju značajnu primenu u mnogim oblastima [Bravo, 1998]. Po svom biološkom značaju (pre svega antioksidativnoj aktivnosti) naročito se ističu fenolna jedinjenja koja imaju dve ili tri hidroksilne grupe na susednim (vicinalnim) ugljenikovim atomima benzenovog prstena [Heim *et al.*, 2002; Rice-Evans *et al.*, 1996, 1997]. Jedna od najznačajnijih karakteristika navedenih grupa fenolnih jedinjenja je relativna lakoća oksidacije, odnosno autooksidacije, što je od neposrednog značaja za njihovu biološku aktivnost [Gupta *et al.*, 2002; Miyazaki *et al.*, 2004; Nicolis *et al.*, 2008].

Poslednjih godina mnoga istraživanja su se bavila ispitivanjem antioksidativne aktivnosti polihidroksilnih fenola. Rezultati pokazuju da postoji uska povezanost između ove njihove aktivnosti i struktura odgovornih za potencijalnu zaštitu organizma od malignih i kardiovaskularnih oboljenja [Nijveldt *et al.*, 2001; Ren *et al.,* 2003; Upadhyay *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2001]. Veliki broj *in vitro* studija potvrđuju pozitivan efekat polifenola i njihov antioksidativni efekat na procese unutar ćelija sisara, npr. zgrušavanje krvi, oksidaciju lipoproteina male gustine (LDL), dilataciju krvnih sudova, ekspresiju gena, signalizaciju između ćelija, modulaciju enzimskih aktivnosti, deaktivaciju kancerogenih supstanci i detoksikaciju. Tako da na osnovu nevedenog mogu dodatno ispoljiti i antikancerogeno dejstvo *in vivo* [Inoue *et al.*, 2000; Sakagami *et al.*, 1997; Sakaguchi *et al.*, 1998; Serrano *et al.*, 1998].

Slobodni radikali predstavljaju reaktivne vrste koji u organizmu mogu nastati spontano ili prilikom transformacije endogenih i egzogenih biomolekula i ksenobiotika. Pretpostavka je da promene fizičko-hemijskih parametara utiču na proces autooksidacije, na njenu brzinu i finalne proizvode [Guresir *et al.*, 2005]. Antioksidativna sposobnost polifenola rezultat je njihove sposobnosti da reaguju sa slobodnim radikalima i da ih na taj način neutrališu njihovo štetno delovanje. Postoji nekoliko mehanizama preko kojih se ovo može odigrati. Jedan od njih uključuje transfer vodonikoviog atoma sa polifenola na slobodni radikal. Drugi uključuje transfer elektrona [Di Meo *et al.*, 2013].

Polifenolna jedinjenja sa tri susedne (vicinalne) hidrokislne grupe predstavljaju jedinjenja koja su široko rasprostranjena u prirodi, pre svega u voću i povrću kao i u drugim prehrambenim proizvodima [Kahkonen *et al.*, 1999; Milić *et al.*, 1998; The Merck Index, 12th ed.; Saeki *et al.*, 2000]. Njihova široka rasprostranjenost u ishrani omogućava kontinuiran unos ovih supstanci u ljudski organizam [Scalbert *et al.*, 2005].

Pirogalol je osnovni vicinalni trihidroksilni fenol koji u organizmu, u zavisnosti od uslova sredine, pokazuje prooksidativne ili antioksidativne efekte. U zavisnosti od ispoljenog efekta potencira toksične ili zaštitne mehanizme u organizmu [Yamada *et al.*, 2003].

Galna kiselina je po hemijskoj stukturi slična pirogalolu i na položaju C_1 benzenovog prstena poseduje karboksilnu grupu i predstavlja poznati antioksidans [Yilmaz & Toledo, 2004].

Etil-galat je antioksidans koji se nalazi u različitim koncentracijama u mnogobrojnim prehrambrenim proizvodima kao aditiv E313, čija je uloga zaštita namirnica od oksidacionih procesa. U novije vreme vršena su ispitivanja biološke aktivnosti i biomedicinske primene etil-galata [Gotes *et al.*, 2012; Kime *et al.*, 2012; Mehla *et al.*, 2011].

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivana je autooksidacija navedenih jedinjenja u zavisnosti od strukture i spoljašnjih uslova kao što je pH vodenog rastvora i prisustvo M(II) dijamagnetnih metalnih jona.

Dvovalentni dijamagnetni joni u biološkim sistemima imaju gradivnu ulogu ili ulaze u sastav metaloenzima neophodnih za važne biohemijske procese. Pored navedenog neki M(II) joni su značajni zbog toksikološkog efekta na žive organizme. Poznata je činjenica da na proces autoksidacije orto hidroksilnih fenola mogu uticati dvovalentni dijamagnetni joni, zbog stabilizacije orto hidroksilni radikala [Eaton, 1964; Felix & Sealy, 1982]. Iz tog razloga predmet ove disertacije bilo je ispitivanje uticaja prisustva dvovalentnih dijamagnetnih jona na autoksidaciju vicinalnih trihidroksilnih fenola.

U literaturi se mogu naći podatci koji se odnose na transformacije vicinalnih dihidroksilnih (*orto*-dihidroksi) i trihidroksilnih fenolnih jedinjenja u različitim uslovima [Barclay *et al.*, 1999]. Istraživanja pokazuju da promena pH ima uticaja na autooksidaciju vicinalnih dihidroksilnih polifenola [Roginsky & Alegria, 2005; Schüsler-Van Hees *et al.*, 1985]. U radovima su publikovani rezultati ispitivanja uticaja jona metala na oksidaciju i autooksidaciju vicinalnih dihidroksilnih fenolnih jedinjenja [Kalyanaraman *et al.*, 1984; Kamau i Jordan, 2002; Lebedev *et al.*, 2008, 2011], dok su ispitivanja uticaja na autooksidaciju vicinalnih trihidroksilnih fenolnih jedinjenja manje zastupljena [Nikolić G.M *et al.*, 2010, 2011a,b]. Imajući u vidu zastupljenost dijamagnetnih dvovalentnih jona metala u biološkim sistemima (Ca(II), Mg(II) i Zn(II) joni se nalaze u svim živim organizmima) i njihov toksikološki značaj (npr. Sr(II), Ba(II), Cd(II) i Pb(II) joni) i dokumentovanu mogućnost njihove interakcije sa polihidroksilnim fenolnim jedinjenjima u toku njihove

transformacije pod različitim uslovima, očigledan je značaj detaljnog ispitivanja uticaja dijamagnetnih dvovalentnih jona metala na autooksidaciju vicinalnih trihidoksilnih fenolnih jedinjenja.

Na osnovu ranijih istraživanja koja pokazuju promene u procesu autookisdacije u zavisnosti od pH sredine i prisustva dvovalentnih metalnih jona [Abrash *et al.*, 1989; Friedman & Jurgens, 2000; Lebedev *et al.*, 2007; Tulyathan *et al.*, 1989; Park *et al.*, 2007], ispitivana je mogućnost promene kinetike sa povećanjem pH sredine, uz mogućnost da se nagrade različiti proizvodi autoksidacije. Takođe ispitivana je mogućnost promene kinetike procesa u prisustvu metalnih jona, zbog stabilizacije hinonskih radikala. Veličina jona, polarizabilnost, elektronegativnost i energija hidratacije su fizičko-hemijski parametri koji mogu da odrede na koji način i u kojoj meri će metalini joni pokazati efekat na procese autooksidacije.

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivan je uticaj jona zemnoalkalnih metala (Ca(II) i Mg(II) zbog neposrednog biološkog značaja, a Sr(II) i Ba(II) zbog toksikološkog značaja) kao i još nekih dijamagnetnih dvovalentnih jona metala (Zn(II) zbog neposrednog biološkog značaja, a Cd(II) i Pb(II) zbog toksikološkog značaja) na autooksidaciju nekih značajnih vicinalnih trihidroksilnih fenolnih jedinjenja. Istraživanja su obuhvatila procese autooksidacije pirogalola (1,2,3-trihidroksibenzen), najjednostavnije jedinjenje sa vicinalnom trihidroksilnom strukturom, galne kiseline (3,4,5-trihidroksibenzoeva kiselina) koja je zastupljena u mnogim biljkama i ima značajno biološko delovanje i etil-galata (etil-3,4,5-trihidroksibenzoat) koji se u svojstvu antioksidanta koristi kao dodatak prehrambenim proizvodima (aditiv sa komercijalnom oznakom E313).

Ispitivanja su realizovana korišćenjem sledećih tehnika i metoda:

Ultraljubičasta i vidljiva (UV/Vis) spektrofotometrija – omogućila je praćenje toka reakcije u ispitivanim model sistemima. Obrada spektrofotometrijskih podataka matričnom metodom po Coleman-u omogućila je određivanje broja apsorbujućih vrsta u toku procesa autooksidacije, a primena MCR-ALS (Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Squares) metode omogućila je dobijanje spektara individualnih komponenti kao i određivanje kinetičkog profila reakcije.

Elektron spin rezonantnom (ESR) spektroskopijom izvršeno je određivanje strukture prelaznih slobodno-radikalskih vrsti koje nastaju u procesu autooksidacije.

Tečna hromatografija visokih performansi (HPLC) – omogućila je razdvajanje proizvoda reakcije autooksidacije, dok je DAD (Diode Array Detector) detektor omogućio delimičnu karakterizaciju razdvojenih komponenti.

Masena spektrometrija (MS) – omogućila je utvrđivanje strukture stabilnih proizvoda autooksidacije.

Ovim ispitivanjima utvrđena je potencijalna struktura prelaznih (slobodno-radikalskih) vrsta koje nastaju u toku autooksidacije kao i stabilnih proizvoda autooksidacije fenolnih jedinjenja u prisustvu dijamagnetnih dvovalentnih jona biometala (Mg(II), Ca(II), Zn(II)) i toksičnih metala (Sr(II), Ba(II), Cd(II), Pb(II)). Na ovaj način dobijeni su podaci koji su omogućili detaljniji uvid u mehanizme kojima se ostvaruje antioksidativna aktivnost ispitivanih jedinjenja, što je od značaja za potpunije sagledavanje njihove biološke aktivnosti kao i dalje humane primene.

2. Opšti deo

2.1. Oksidativni procesi i slobodni radikali

Redoks reakcije (reakcije redukcije i oksidacije) uključuju sve hemijske reakcije u kojima atomi menjaju svoje oksidaciono stanje odnosno na reakcije u kojima dolazi do transfera elektrona. Ove reakcije mogu biti jednostavne kao što je oksidacija ugljenika i stvaranje ugljen-dioksida, ali i složene kao što je oksidacija glukoze u ljudskom organizmu koja se odigrava preko niza kompleksnih procesa transfera elektrona. Često se oksidacione reakcije povezuju sa formiranjem oksida pomoću molekulskog kiseonika, iako su te reakcije samo specifični primeri uopštenih reakcija transfera elektrona.

Autooksidacija je svaka oksidacija koja se odigrava u prisustvu molekulskog kiseonika sa ili bez UV zračenja i pri čemu dolazi do formiranja reaktivnih kiseoničnih vrsta. Iako svi tipovi organskih molekula mogu da se oksiduju pomoću kiseonika, neki molekuli su posebno skloni autooksidaciji, a među kojima se izdvaju nezasićena jedinjenja koja imaju hidroksilne grupe na benzenovom pristenu [Burton *et al.*, 1985]. Reakcija autooksidacije odvija se po slobodno-radikalskom mehanizmu.

Slobodni radikali predstavljaju atome, jone i molekule koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi. Slobodni radikali mogu biti neutralni, pozitivno (katjon radikal) i negativno naelektrisani (anjon radikal). Nespareni elektroni su uzrok njihove visoke i neselektivne reaktivnosti i nestabilnosti. U organskim radikalima nespareni elektron može biti lokalizovan na atomima različitih elemenata, pa se po tome slobodni radikali mogu podeliti na slobodne radikale (reaktivne slobodno-radikalske vrste) kiseonika, hlora, azota itd.

Reaktivne vrste se dele na reaktivne slobodno-radikalske i neradikalske (oksidaciona sredstva koja lako prelaze u slobodne radikale). Najvažnije reaktivne kiseonične vrste (ROS – od engl. Reactive Oxygen Species) predstavljene su u tabeli 2.1.

Tabela 2.1. Najvažnije reaktivne slobodno-radikalske i kiseonične neradikalske vrste.

Slobodnoradikalske vrste	Neradikalske vrste
Superoksid anjon radikal, $O_2^{\bullet -}$	Vodonik peroksid, H_2O_2
Hidroksil radikal, $^{\bullet}OH$	Hipobromasta kiselina, HOBr
Hidroperoksil radikal, $HO_2^{\bullet}$	Hipohlorasta kiselina, HOCl
Peroksil radikal, $RO_2^{\bullet}$	Ozon, O_3
Alkoksil radikal, $RO^{\bullet}$	Singletni kiseonik, $^1O_2$
Karbonatni radikal, $CO_3^{\bullet -}$	Organski peroksid, ROOH
Ugljenoksidni radikal, $CO_2^{\bullet -}$	Peroksinitrit, $ONOO^-$

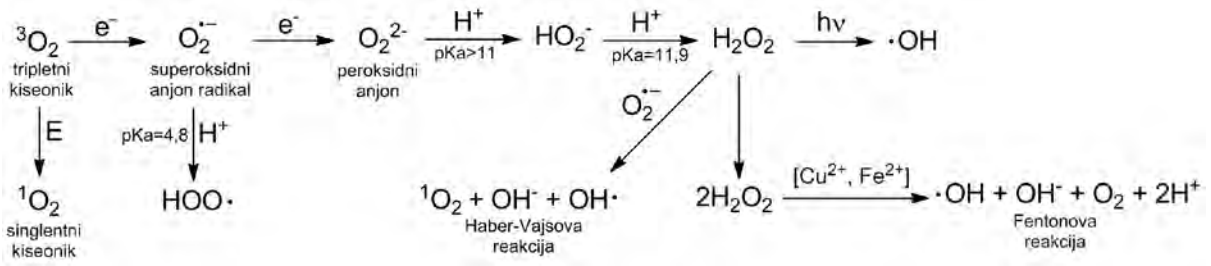
Slobodni radikali spadaju u najreaktivnije hemijske vrste. Zbog svoje visoke hemijske reaktivnosti oni lako stupaju u rekcije, međusobno ili sa drugim molekulima. Reakcije se odigravaju ka građenju novih hemijskih veza od nesparenih elektrona, što dovodi sistem u stanje niže energije.

U biološkim sistemima slobodni radikali se mogu stvarati u mnogim procesima kao što su: apsorpcija radijacije, fagocitoza, biotransformacija egzogenih i endogenih supstrata u endoplazmatičnom retikulumu, enzimske reakcije koje katalizuju oksidaze, itd. Količina slobodnih radikala u živim ćelijama se značajno povećava usled aerozagađenja, pušenja, izlaganja sunčevoj svetlosti, izlaganja stresu, hroničnih bolesti, infekcija i genetskih predispozicija prema bolesti [Blokhina et al., 2003].

Slobodni radikali nastaju i u toku normalnih metaboličkih procesa. Preko 90% kiseonika iz vazduha u organizmu sisara redukuje se do vode primanjem četiri elektrona od transportnog sistema elektrona u respiratornom lancu mitihondrija [Acworth, 2003].

Pri standardnoj temperaturi i pritisku kiseonik je gas prisutan sa 20,9% zapreminskog udela u atmosferi. To je diatomni molekul formule O_2 sa molekulskom elektronskom konfiguracijom O_2: $1\sigma^2 2\sigma^2 3\sigma^2 \pi_{xy}^4 \pi^*_{xy}{}^2$.

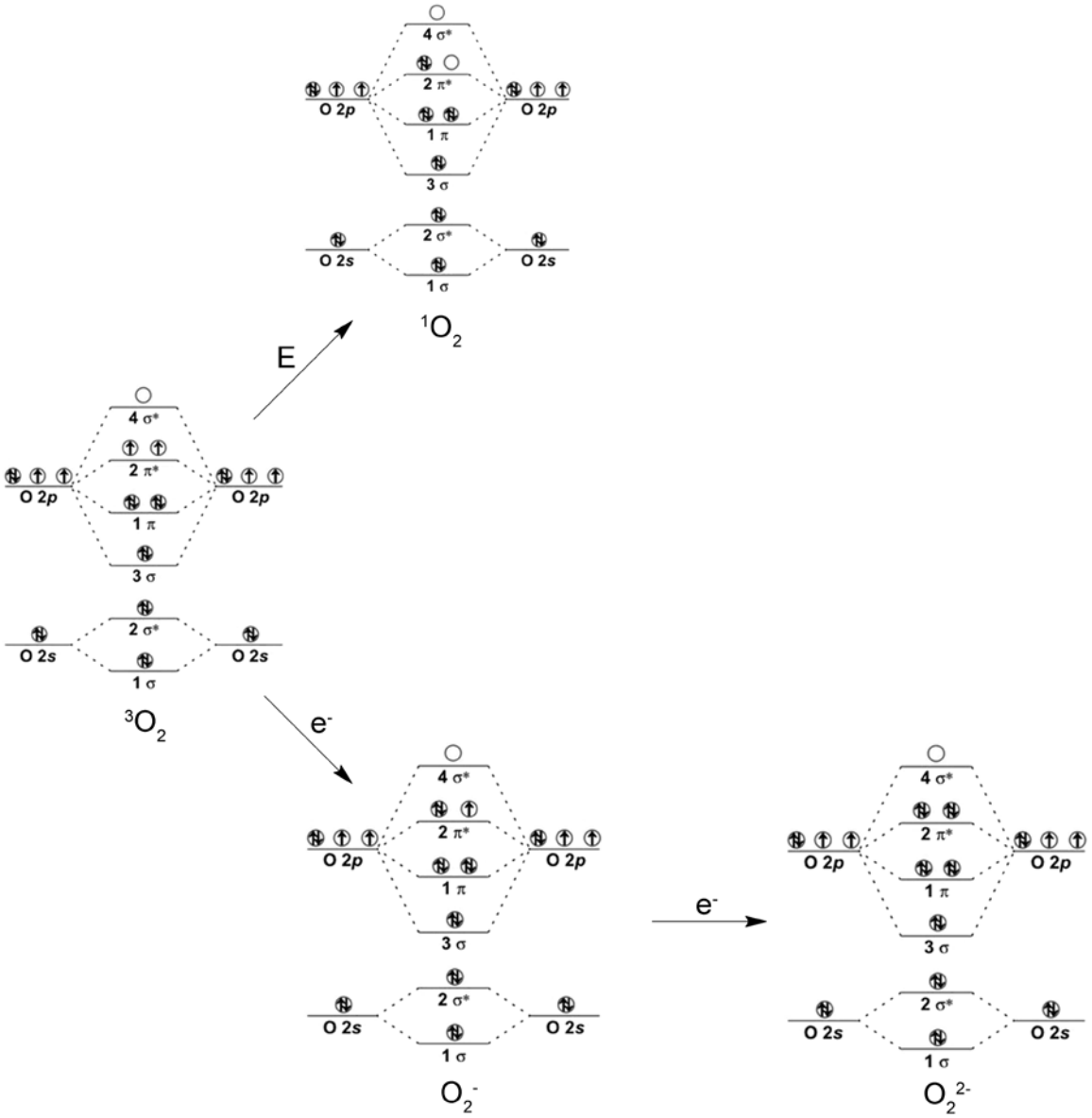
Triplet $^3O_2$ predstavlja najstabilniji oblik kiseonika. Tripletni kiseonik je biradikal sa dva nesparena elektrona, koji imaju isti spinski kvantni broj i locirani su u suprotno orijentisanim antivezivnim π* orbitalama. Na šemi 2.1. prikazano je nastajanje ROS-a iz tripletnog kiseonika.



Šema 2.1. Reakcije stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta.

Iz osnovnog stanja, triplet $^3O_2(^3\Sigma)$, kiseonik može da pređe u reaktivnije stanje, singlet $^1O_2(^1\Delta)$, dovođenjem energije. Energija omogućava da se ukloni spinska restrikcija i samim tim poveća oksidaciona sposobnost molekula kiseonika.

Na slici 2.1. prikazani su dijagrami molekulskih orbitala za tripletni i singletni kiseonik, superokid anjon i peroksidni anjon i prelazi među navedenim reaktivnim kiseoničnim vrstama.



Slika 2.1. Dijagrami molekulskih orbitala za $^3O_2$, $^1O_2$, O_2^- i O_2^{2-}.

Superoksid anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$) odnosno njegov protonovani oblik, peroksilni radikal ($HO_2^{\bullet}$), nastaje redukcijom jednim elektronom molekulskog kiseonika, a može se dobiti i oksidacijom vodonik peroksida. Značajne količine stvaraju se u reakcijama katalizovanim nekim oksidazama (npr. ksantin oksidazom) [Ohara *et al*., 1993].

Superoksidni anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$) se može i oksidovati i redukovati. Pri nižim pH vrednostima postoji kao protonovani hidroperoksil radikal ($HOO^{\bullet}$). Hidroperoksil radikal nastaje u reakciji vodonik peroksida i hidroksil radikala ($HO^{\bullet}$):

$$HO^{\bullet} + H_2O_2 \rightarrow HOO^{\bullet}(H^+ + O_2^{\bullet-}) + H_2O \quad (2.1)$$

Hidroperoksil radikal ($HOO^{\bullet}$) može nastati i reakcijom tripletnog kiseonika i atoma vodonika koji nastaje iz vode. Ekscitovano stanje molekula vode (H_2O^*) se postiže adsorpcijom energije koja molekul vode hidrolitički razlaže na atom vodonika ($H^{\bullet}$) i hidroksil radikal ($HO^{\bullet}$) za 10^{-14}-10^{-13}s [Halliwell & Gutteridge, 2001]:

$$2\ H_2O \rightarrow H_2O^+ + H_2O^* + e^-_{aq} \quad (2.2)$$

$$H_2O^* \rightarrow H^{\bullet} + HO^{\bullet} \quad (2.3)$$

$$H^{\bullet} + O_2 \rightarrow HOO^{\bullet} \rightarrow H^+ + O_2^{\bullet-} \quad (2.4)$$

Hidroksil radikal ($^{\bullet}OH$) je najreaktivniji od svih ROS-a i najodgovorniji je za toksične efekte kiseonika. Kratak poluživot hidroksil radikala može se povezati sa velikom brzinom reakcije sa biomolekulima. Haber-Vajsova ili Fentonova reakcija, ako postoji mogućnost odigravanja u ćelijama, takođe mogu generisati hidroksil radikal. Dejstvo γ-zračenja na molekul vode, proces fagocitoze, troelektronska redukcija molekulskog kiseonika u respiratornom lancu unutar mitihondrija, takođe mogu generisati hidroksil radikal.

Hidroksil radikal može nastati i iz vode i iz vodonik peroksida. Dejstvo zračenja visoke energije, γ - zraci, na vodu, dovodi do sledećih reakcija [Jacobien *et al.*, 1996]:

$$2\ H_2O \rightarrow H_2O^+ + H_2O^* + e^-_{aq} \quad (2.5)$$

$$H_2O^* \rightarrow H^{\bullet} + HO^{\bullet} \quad (2.6)$$

$$H_2O^+ + H_2O \rightarrow H_3O^+ + HO^{\bullet} \quad (2.7)$$

Hidroksil radikali mogu nastati i dejstvom UV zračenja na vodonik peroksid u vodi, gde dolazi do raskidanja veze kiseonik-kiseonik. Takođe prisustvo prelaznih metala u vodi može da dovede do raskidanja veza kiseonik-kiseonik u vodonik peroksidu i do stvaranja hidroksil radikala [Salem *et al.*, 2000].

$$H_2O_2 + h\nu \rightarrow 2\ HO^{\bullet} \quad (2.8)$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^- + HO^\bullet \quad (2.9)$$

Reakcija vodonik-peroksida i superoksidnog anjona, Haber-Vajsovova reakcija, takođe stvara hidroksilne radikale [Hu & Jiang, 1996]:

$$H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \rightarrow O_2 + HO^- + HO^\bullet \quad (2.10)$$

Dismutacijom $HOO^\bullet$ može nastati vodonik peroksid:

$$HOO^\bullet + HOO^\bullet \rightarrow H_2O_2 + O_2 \quad (2.11)$$

Kako nema nesparene elektrone singletni kiseonik ne možemo da okarakterišemo kao slobodni radikal. Međutim singletni kiseonik sadrži veliku količinu energije 93,6 kJ/mol što ga svrstava u ROS. U vodenom rastvoru singletni kiseonik prelazi u triplet i predaje energiju vodenom sistemu.

Vodonik peroksid (H_2O_2) se ubraja u ROS iako nije slobodni radikal. Najstabilniji je, odnosno najmanje reaktivan intermedijer redukcije kiseonika. Može nastati direktno dvoelektronskom redukcijom molekulskog kiseonika, jednoelektronskom redukcijom superoksid anjon radikala ili dejstvom superoksid dismutaze u vodenom rastvoru:

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2 \quad (2.12)$$

Proces stvaranja vodonik peroksida odvija se na nivou peroksizoma, mitohondrija, mikrozoma i ćelijske membrane.

Singletni kiseonik ($^1O_2$) je izrazito reaktivan, nastaje enzimskim putem u prisustvu mieloperoksidaza i laktoperoksidaza.

Reaktivnost kiseoničnih vrsta može se prikazati nizom gde reaktivnost reaktivnih kiseoničnih vrsta opada [Karbowiak *et al.*, 2010]:

Tripletni kiseonik < superoksidni anjon < hidroperoksidni radikal < peroksidni anjon < hidroksil radikal

Na osnovu prikazanog niza može se videti da je najmoćniji oksidans ili najreaktivniji ROS hidroksil radikal. Njegovo vreme poluživota u vodenom rastvoru iznosi 10^{-6}s i hidroksil radikal je sposoban da brzo oksiduje većinu organskih molekula [Choe & Min, 2005].

2.1.1. Antioksidansi

Antioksidansi su "supstance koje prisutne u malim koncentracijama u odnosu na supstrat (biomolekul) koji se oksiduje, značajno usporavaju ili sprečavaju oksidaciju tog supstrata", po najprihvaćenjijoj definiciji koju je dao Halliwell [Halliwell, 1990]. Tokom reakcija oksidacije mogu nastati slobodni radikali koji dalje započinju lančane reakcije. Kada se slobodnoradikalske lančane reakcije odigravaju u ćeliji mogu da izazovu oštećenje ćelije ili njenu smrt. Antioksidansi zaustavljaju slobodno radikalske reakcije tako što uklanjaju intermedijere i sprečavaju dalje reakcije oksidacije. Kako se oni sami oksiduju, antioksidansi su redukcioni agensi kao što su tioli, askrobinska kiselina i polifenolna jedinjenja. Mehanizmi po kojima supstance ispoljavaju svoje antioksidativne osobine su različiti i zavise kako od supstance tako i od samog supstrata. U reakcijama sa hidroksil radikalima antioksidansi pokazju sposobnost da:

- deluju kao "hvatači" (skevindžeri) slodobnih radikala
- deluju kao donori elektrona ili
- donori H-atoma

dok u reakcijama sa ugljeničnim slobodnim radikalima pokazuju sposobnost da:

- deluju kao akceptori elektrona
- deluju kao akceptori H-atoma

Paradoks metabolizma je da je većini živih bića neophodan kiseonik koji je veoma reaktivan molekul i koji oštećuje organizme preko ROS-a. Iz tog razloga organizmi imaju složene antioksidativne sisteme, endogene antioksidanse, koji se sastoje od metabolita i enzima koji zajedno sprečavaju oksidativno oštećenje ćelijskih komponenti kao što su DNK, proteini i lipidi. Antioksidativni sistemi ili sprečavaju da se formiraju reaktivne vrste ili ih uklanjaju pre nego što oštete vitalne ćelijske komponente. Ponekad se u organizmu formira više ROS-a nego što antioksidativni sistemi mogu da ih uklone i tada dolazi do stanja u ćeliji poznatog kao oksidativni stres. Oksidativni stres je uzrok mnogih oboljenja kao što je kancer, kardiovaskularna i neurodegerativna oboljenja. Da bi se sprečio nastanak oksidativnog stresa neophodno je prisustvo egzogenih antioksidansa koji se unose kao dijetetski suplementi.

Antioksidansi se prema rastvorljivosti u vodi dele na hidrofilne i hidrofobne. Hidrofilnim antioksidansima primarno mesto delovanja je ćelijski citosol i krvna plazma, dok je hidrofobnim to ćelijska membrana gde sprečavaju lipidnu peroksidaciju.

Prema nivou i načinu delovanja u ljudskom organizmu antioksidansi su klasifikovani na: preventivne antioksidante, "skevindžer" antioksidante i "reparacione" antioksidante [Shi *et al.*, 2001]. Sprečavanje nastanka slobodnih radikala osnovna je karakteristika preventivnih antioksidansa. Sposobnost da "hvataju" slobodne radikale osnovna je karakteristika "skevindžer" antioksidansa, a "reparacioni" antioksidanti deluju posebnim mehanizmima, obnavljajući ili uklanjajući oštećene vitalne biomolekule koji nastaju u uslovima oksidativnog stresa. U "reparacione" antioksidante ubrajaju se fosfolipaze, proteaze, enzimi koji obnavljaju DNK, transferaze, itd.

Antioksidansi značajni za ljudski organizam se prema mestu nastajanja dele na endogene i egzogene. Endogeni antioksidanti predstavljaju antioksidante koji nastaju u ljudskom organizmu, dok se egzogeni unose putem hrane ili lekova. Polifenolna jedinjenja su jedna od najvažnijih grupa prirodnih egzogenih antioksidanata, čija je aktivnost uslovljena strukturnim karakteristikama [Rice-Evans *et al.*, 1996].

Neka jedinjenja doprinose antioksidativnoj odbrani tako što imaju funkciju helatizirajućih agenasa prema jonima teških i prelaznih metalia. Na ovaj način oni sprečavaju metalne jone da katalizuju proizvodnju slobodnih radikala u ćeliji.

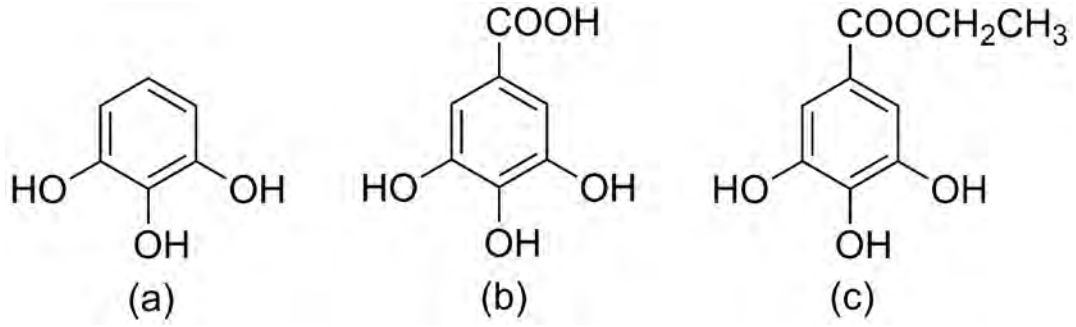
Pored antioksidativnih osobina veliki broj antioksidanasa može da se pokaže i prooksidantno delovanje, povećavajući produkciju slobodnih radikala i samim tim povećavajući oksidativni stres u ćeliji. Da li neki molekul da ispoljava prooksidativne osobine zavisi od njegovih strukturnih karakteristika i uslova u kojima ispoljava svoje dejstvo (pH, koncentracija).

2.1.2. Autooksidacija vicinalnih polihidroksilnih fenola

Fenolna jedinjenja predstavljaju široko rasprostranjenu grupu biljnih metabolita. Oni mogu imati jednostavnu strukturu kao što fenolne kiseline ili mogu imati složene polikondezovane strukture nastale od jednostavnih fenola (proantocijanidoli). Do danas je u biloškim sistemima identifikovano više od hiljadu fenolnih jedinjenja, kako u slobodnom obliku tako i u obliku glikozida [Leucuta *et al.*, 2005]. Zajednička karakteristika fenolnih jedinjenja je da sadrže aromatični prsten sa jednom ili više hidroksilnih grupa. Po biološkom značaju

izdvajaju se jedinjenja sa dve ili više vicinalnih (susednih) hidroksilnih grupa na benzenovom prstenu.

Vicinalni trihidroksilni fenoli predstavljaju jedinjenja koja sadrže kao osnovnu grupu molekul pirogalola gde se atomi vodonika iz benzenovog prstena supstituišu hidroksilnim grupama. Jedan od zastupljenijih molekula u prirodi koji se može okarakterisati kao vicinalni trihidroksilni fenol je galna kiselina; ista se često se nalazi u obliku estra (slika 2.2.).



Slika 2.2. Hemijske strukture a) pirogalola, b) galne kiseline i c) etil-galata

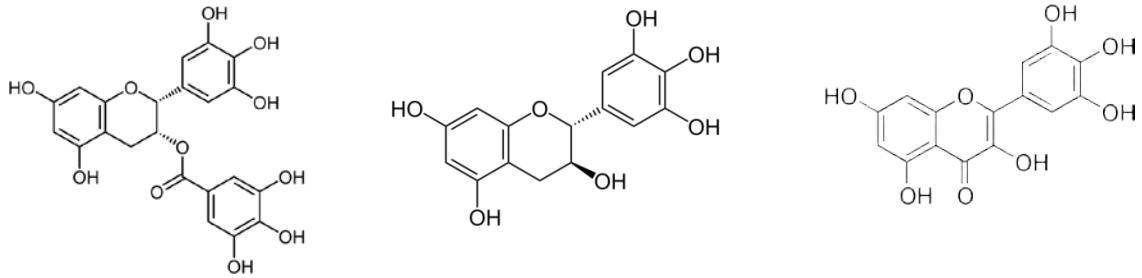
U tabeli 2.2 prikazani su neki karakteristični fizičko-hemijski parametri pirogalola, galne kiseline i etil-galata.

Tabela 2.2. Karakteristični fizičko-hemijski parametri pirogalola, galne kiseline i etil-galata.

	Mw	pKa_1	pKa_2	pKa_3	Rastvor.	logP
Pirogalol	126,11	8,94	11,3	14,7	400,0	1,06
Galna kiselina	170,12	3,94	9,04	11,17	10,0	0,72
Etil-galat	198,17	8,11	11,29	13,77	13,2	1,42

Mw – molekulska masa (g mol^{-1})
pKa – konstante kiselosti.
Rastvor. – rastvorljivost na 25 ^oC (g dm^{-3})
log P – logaritamska vrednost koeficijenta raspodele u sistemu voda/ n-oktanol.

Na slici 2.3. prikazane su strukture nekih značajnih polifenolnih jedinjenja koja u molekulu sadrže tri vicinalne hidroksilne grupe na benzenovom prstenu.



Epigalokatehin-galat Galokatehin Miricetin

Slika 2.3. Hemijske strukture epigalokatehin-galata, galokatehina i miricetina

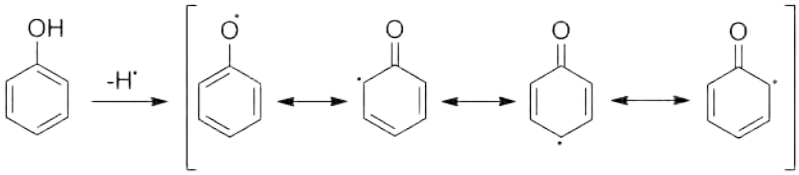
Jedinjenja prikazana na slici 2.3. imaju značajne biološke aktivnosti. Epigalokatehin-galat je polifenol koji se nalazi u zelenom čaju i gde je najprisutniji katehin. U crnom čaju nije identifikovan jer najverovatnije tokom oksidacije prelazi u teaflavine i tearubine. Epigalokatehin-galat je antioksidans sa dokazanim povoljnim dejstvom na biološke sisteme (tretman HIV-a, kancera, hroničnog umora, neurodegenerativnih oboljena). Galokatehin, jedinjenje koje je prisutno u čaju ima dejstvo na kanaboidne receptore. Miricetin je prirodni polifenol koji takođe ima dejstvo na kancerogene ćelije i istraživanja su pokazala da delovanje miricetina može da dovede do smanjenja broja ćelija kancera prostate za 23% [Knekt *et al*., 2002].

Fenolna jedinjenja su sposobna da reaguju sa slobodnim radikalima gde su donori vodonikovih atoma. U reakciji dolazi do eliminacije slobodnog radikala i građenja manje reaktivnog fenoksi radikala:

$$\text{Ar-OH} + \text{ROO}^{\cdot} \rightarrow \text{Ar-O}^{\cdot} + \text{ROOH} \qquad (2.13)$$

$$\text{Ar-OH} + {}^{\cdot}\text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{ArO}^{\cdot} \qquad (2.14)$$

Mogućnost delokalizacije nesparenog elektrona što se može prikazati preko više rezonantnih struktura omogućava relativnu stabilnost fenoksi radikala (šema 2.2.). To omogućava fenolnim jedinjenjima da ulaze u reakcije autooksidacije na kojima se i bazira njihova antioksidativna sposobnost.

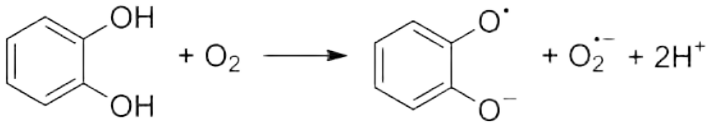


Šema 2.2. Rezonantne strukture fenoksi radikala.

Dokazano je da su vicinalne fenolne funkcionalne grupe značajne za kapacitet hvatanja radikala i da takva jedninjenja lakše ulaze u reakcije autooksidacije. Sa druge strane metoksilacija ili glikozilacija *o*-hidroksi grupa i esterifikacija fenolnih kiselina smanjuju sposobnost autooksidacije i njihovu antioksidativnu sposobnost [Burton *et al*., 1985].

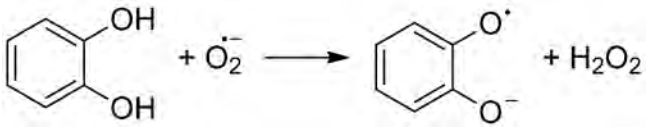
Poboljšana sposobnost vicinalnih di- i trihidroksilnih fenola da ulaze u reakcije autooksidacije u odnosu na druge fenole može se objasniti preko više mehanizama uzimanjem u obzir fizičko-hemijske parametare među kojim su od posebnog značaja: ukupna energija π-orbitala, orbitalna elektronegativnost, parcijalno naelektrisanje, polarizabilnost, rastvorljivost, konstante kiselosti.

Reakcija 2.15 prikazuje početnu fazu autooksidacije katehola, najjednostavnijeg polifenola sa vicinalnim hidroksilnim grupama



(2.15)

Nagrađeni superokid anjon radikal takođe može da oksiduje katehol. Pošto je on bolji oksidans u odnosu na kiseonik reakcija oksidacije je brža (reakcija 2.16). U kontekstu navedene reakcije katehol se ponaša kao skavendžer superoksida. U reakciji se gradi vodinik peroksid koji dalje reaguje relativno sporo sa kateholom.



(2.16)

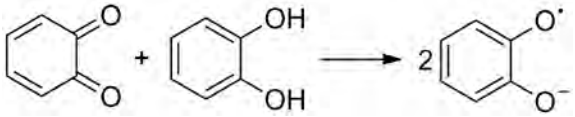
Visoka koncentracija H^+ jona može da zaustavi reakciju autooksidacije jer se H^+ joni ponašaju kao skavendžeri $O_2^{\bullet-}$ i dovodi do reakcije disproporcije.

$$2O_2^{\bullet-} + 2\,H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2 \qquad (2.17)$$

Semihinon koji može nastati u predhodno navedenim rekacijama se ponaša kao bolji elektron donor u odnosu na katehol i reaguje sa molekulskim kiseonikom u daljem procesu autooksidacije.

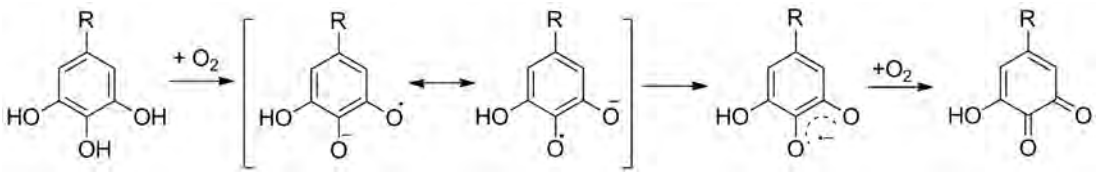
(2.18)

Nagrađeni hinon može da reaguje sa kateholom i da nagradi semihinon.



(2.19)

Sličan pristup se može primeniti i na razmatranje autooksidacije vicinalnih trihidroksilnih fenola (pirogalol, galna kiselina, etil-galat i dr.). Navedeni molekuli ulaze u proces autooksidacije gde se kao prvi proizvod gradi odgovarajući hinon. Reakcija je prikazana na šemi 2.3. Nagrađeni semihinonski radikal u zavisnosti od toga da li je nastao iz pirogalola, galne kiseline ili etil-galata ulazi u dalje procese autooksidcije, koji se odigravaju po različim mehanizmima za svaki navedeni molekul uz nastajanje različitih proizvoda.



Šema 2.3. Reakcije autooksidicije vicinalnih trihidroksilnih fenolnih jedinjena (pirogalol R=H, galna kiselina R=COOH i etil-galat R=$COOCH_2CH_3$) do hinonskih molekula.

Kao i druge slobodnoradikalske reakcije tako i autooksidacija vicinalnih trihidroksilnih fenolnih (PP) molekula prati opšti mehanizam koga karakterišu faze inicijacije, propagacije i terminacije. Reakcije su praćene građenjem različitih semihinonskih radikala (SQ) i hinonskih molekula (QQ) u zavistosti od polaznog vicinalnogtrihidroksilnog molekula.

$PP + O_2 \rightarrow SQ^{-\bullet} + O_2^{-\bullet} + 2H^+$ (inicijacija) (2.20)

$PP + O_2^{-\bullet} \rightarrow SQ^{-\bullet} + H_2O_2$ (2.21)

$SQ^{-\bullet} + O_2 \rightarrow QQ + O_2^{-\bullet}$ (propagacija) (2.22)

$SQ^{-\bullet} + O_2^{-\bullet} + + 2H^+ \rightarrow QQ + H_2O_2$ (2.23)

$2SQ^{-\bullet} + 2H^+ \rightarrow PP + QQ$ (2.24)

$2\ O_2^{-\bullet}\ 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (terminacija) (2.25)

2.2. Dijamagnetni joni metala i njihov biološki značaj

Metali su sveprisutni u različitim biološkim sistemima, od najjednostvanijih organizama do čoveka. Količina biometala u različitim organizmima varira od tragova do nekoliko grama. Biometali u biloškim sistemima stupaju u interakciju sa molekulima koji mogu biti veoma mali organski i neorganski molekuli kao i makromolekuli kao što su npr. proteini ili DNK. Način na koji interaguju odlučuje kakva je uloga biometala u biološkim sistemima, te ona može biti gradivna, funkcionalna, katalitička itd. Pored paramagnetnih biometalnih jona kao što su joni gvožđa, mangana i bakra, poseban značaj imaju i dijamagnetni joni kao što su joni kalcijuma, magnezijuma i cinka. Joni sličnih fizičko-hemijskih karakteristika (veličina jona, naelektrisanje, polarizabilnost, jonski potencijal) mogu da zamene navedene biometale. Jednom unešeni u organizam oni pokazuju toksične efekte.

Unos biometala je najčešće preko hrane i vode, mada se mogu unositi i preko dijetetskih suplemenata i farmaceutskih proizvoda.

Najznačajnije fizičko-hemijske karakteristike jona koji su ispitivani u ovoj disertaciji predstavljene su u tabeli 2.3.

Tabela 2.3. Atomski broj elementa (Z), jonski radijus (Ir), elektronegativnost (En) i entalpija hidratacije ispitivanih metalnih M(II) jona čiji je uticaj na autooksidaciju fenolnih jedinjenja ispitivan.

	Simbol	Z	Ir (pm)	En	$\Delta H_h°$ (kJ/mol)
Magneziijum	Mg	12	66	1,31	-1926
Kalcijum	Ca	20	99	1	-1579
Stroncijum	Sr	38	112	0,95	-1446
Barijum	Ba	56	134	0,89	-1309
Cink	Zn	30	74	1,65	-2047
Olovo	Pb	82	120	1,8	-1485
Kadmijum	Cd	48	97	1,69	-1809

2.2.1. Zemnoalkalni metali

U grupu zemnoalkalnih metala spadaju berilijum (Be), magnezijum (Mg), kalcijum (Ca), stroncijum (Sr), barijum (Ba) i radijum (Ra). Ova grupa se nalazi u S bloku preriodnog sistema. Po savremenoj IUPAC nomenklaturi oni se nazivaju elementi 2 grupe, a nekadašnji naziv im je bio i elementi grupa II A.

Ova grupa dobila je naziv po svojstvu svojih oksida da daju bazne vodene rastvore. Ovi oksidi imaju visoku temperaturu topljenja tako da ostaju u čvrstom stanju ("earths") u vatri. Zemnoalkalni metali su dobar primer kako se hemijske i fizičke osobine pravilno menjanju unutar grupe sa porastom atomskog broja.

Svi zemnoalkalni metali u osnovnom stanju imaju dva elektrona u valentnom nivou, a otpuštanjem dva elektrona formiraju dijamagnetne jone sa stabilnom konfiguracijom najbližeg plemenitog gasa.

Biološki značaj zemnoalkalnih metala se ogleda u sledećem:

Berilijumova slaba rastvorljivost u vodi dovodi do toga da je slabo dostupan biološkim sistemima. Kada dospe u organizam berilijum je veoma toksičan.

Magnezijum i kalcijum su sveprisutni i esencijalni za sve žive organizme u kojima imaju različite uloge.

Stroncijum i barijum imaju manju dostupnost u biosferi. Ovi joni su toksični, mada neka jedinjenja imaju primenu u medicini.

Radijum je vrlo malo zastupljen u biosferi i veoma radioaktivan, što ga čini toksičnim za živi svet.

2.2.1.1. Magnezijum

Magnezijum je relativno rasprostranjen biometal i u Zemljinoj kori nalazi se na sedmom mestu, gde doprinosi sa 7% mase. Zahvaljujući rastvorljivosti magnezijumovog jona, on se nalazi na trećem mestu u morskoj vodi, iza jona natrijuma i hlora. U biljnom svetu magnezijum ima značajnu ulogu jer je centralni jon hlorofila. U organizam se unosi preko hrane. Značajnije namirnice biljnog porekla koje sadrže magnezijum su (mg/100g namirnice): banane 29, kupine 19, maline 22, jagode i kivi 13, ananas 17, grejp, pomorandža i bundeva 10, kukuruz 45, avokado 29, artičoke 22, brokoli 18, masline 22, krompir 22, spanać 48 [www.fnic.nal.usda.gov].

Magnezijum je jedanaesti element po sadržaju u ljudskom telu; njegovi joni su esencijali za sve žive ćelije, gde imaju važne uloge u upravljanju važnim biološkim fosfatnim jedinjenjima, kao što su ATP, DNK i RNK. Magnezijum ulazi u sastav velikog broja enzima i omogucava njihovu funkciju. U medicini magnezijumova jedinjenja se koriste kao uobičajni laksativi, antacidi (magnezijumovo mleko) i u velikom broju slučajeva kada je neophodna stabilizacija abnormalne nervne pobuđenosti i spazma krvnih sudova. Oko 50% ukupnog magnezijuma skladišti se u kostima dok ostatak se nalazi uglavnom unutar ćelija; 50% magnezijuma iz citosoli vezano je za ATP, dok je ostatak zajedno sa kalijumom vezan za ribozome. Intracelularna koncentracija slobodnog magnezijuma je oko 0,5 mM. Manje od 0,5% magnezijuma se nalazu u krvnoj plazmi.

Magnezijum poseduje karakteristike koje ga čine jedinstvenim među biološki značajnim katjonima. Mg(II) jon ima najmanji jonski radijus od svih, dok je njegov hidratisani oblik najveći. Odnos nehidratisanog i hidratisanog oblika je 400 puta, dok je taj odnos kod natrijuma 25, a kod kalijuma 5.

Bitni faktori koji imaju značajnu ulogu u biološkom značaju magnezijuma su njegov koordinacioni broj i koordinaciona geometrija. Magnezijum je isključivo heksa koordinisan, dok npr. kalcijum i kalijum mogu da menjaju koordinacioni broj do 6, 7 i 8 koordinacije. Iz ovog razloga kalcijum može da zauzme fleksibilniju geometriju, ako se uporedi sa katjonima koji moraju da zauzmu oktaedarsku geometriju obaveznu za heksa koordinisanje. Takođe, dužina veze sa oksi ligandima može da varira i do $0,5 \cdot 10^{-10}$ m za kalcijum, dok je kod

magnezijuma ta varijacija $0,2 \cdot 10^{-10}$ m. Magnezijum znatno sporije izmenjuje vodu iz svoje hidratacione sfere u poređenju sa drugim katjonima.

On često učestvuje u strukturi proteina, npr. u ATP vezujućoj kinazi i kod drugih fosforil-transferaza magnezijum se u nalazi u katalitičkom centru, gde je povezan sa četri od pet liganda iz proteina i ATP-a. Ovo ostavlja jedno ili dva koordinaciona mesta slobodna za povezivanje sa molekulima vode. Za razliku od ostalih zemnoalkalnih i alkalnih metala, magnezijum radije vezuje molekule vode nego velike ligande u svoju unutrašnju koordinacionu sferu. Mnoga mesta u proteinima gde je vezan magnezijum imaju samo 3, 4, pa čak i manje direktnih veza sa proteinom, što ostavlja nekoliko slobodnih mesta za vezivanje molekula vode. Zbog odnosa naelektrisanja i poluprečnika magnezijum se ponaša kao "tvrda" Lewisova kiselina u reakcijama, posebno gde su uključene fosforil transferaze i hidroliza fosfosestara. Tipično, magnezijum funkcioniše kao Lewisova kiselina preko aktiviranja nukleofilne veze do reaktivnije anjonske forme (npr. voda do hidroksidnog anjona) ili preko stabilizovanja intermedijera [Crichton, 2008].

Magnezijum je kofaktor u preko 300 reakcija regulisanih enzimima. Enzime koji sadrže magnezijum možemo da podelimo u dve klase. Prva klasa su oni enzimi kod kojih enzim vezuje Mg-supstrat kompleks i uobičajno enzim ima slabu ili nema uopše interakciju sa magnezijum, pošto se vezuje za supstrat. Druga klasa su enzimi kod kojih se magnezijum vezuje direktno, menjajući strukturu enzima i igra katalitičku ulogu. Od 10 enzima uključenih u glikolitički put, pet sadrži magnezijum.

2.2.1.2. Kalcijum

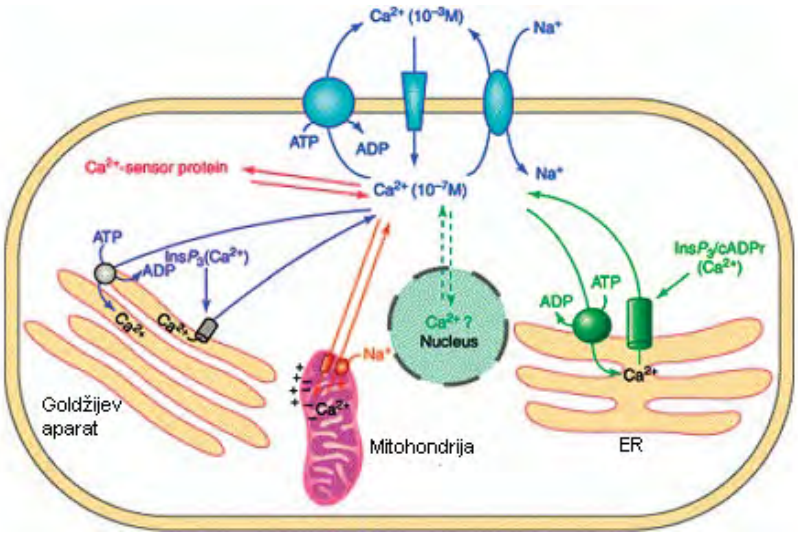
Kalcijum je jedan od najzastupljenijih elementa u Zemljinoj kori. Od svih biometala kalcijum je najzastupljeniji u ljudskom organizmu, 1,5-2% ukupne mase odrasle osobe, gde je najzastupljeniji u kostima u formi hidroksiapatita. Kalcijum je esencijalan za živi svet, posebno u ćelijskoj fiziologiji, gde kretanje jona kalcijuma u i iz citoplazme funkcioniše kao signal za veliki broj ćelijskih procesa. Danas kalcijum prepoznajemo kao interćeliskog signalnog glasnika, koji kako je Ernesto Carafoli poetski rekao "prati ćelije tokom njihovog čitavog života, od oplodnje, do njihove konačne propasti…kao transporter propasti u trenutku smrti ćelija". U ljudski organizam kalcijum se unosi putem hrane. Značajnije namirnice biljnog porekla koje sadrže kalcijum su (mg/100g namirnice): kajsije 20, kupine 30, višnje 21, grejp 20, kivi 29, pomorandža 37, paradajz 37, artičoke 53, brokoli 100, kupus 75, masline 61, spanać 125 [www.fnic.nal.usda.gov].

Kalcijum, zajedno sa natrijumom, kalijumom i magnezijumom, je jedan od metala neophodan za žive sisteme u makro količini. Biominerali koji sačinjavaju zube i kosti sadrže većinu telesnog kalcijuma (~99%). Ipak 1% koji ostaje unutar ćelija i tkiva ima ogroman značaj u regulaciji čitavih serija ćelijskih funkcija. Kao i većina otkrića i ovo je otkriveno slučajno. 1883. engleski fiziolog Sidney Ringer izvodio je eksperiment u kome je potapao srce pacova u slani rastvor napravljen od londonske česmovače (veoma tvrde zbog sadržaja kalcijuma) i posmatrao da je nastavljalo da kuca u dugom vremenskom periodu. Kada je ponovio eksperiment sa destilovanom vodom, srca su prestajala da kucaju nakon ~20 minuta. On je zatim pronašao da dodatak kalcijuma u slani rastvor napravljen od destilovane vode omogućava produženu srčanu kontrakciju, nedvosmisleno pokazujući da kalcijum ima i ulogu u tkivima koje nisu ni kosti ni zubi.

Fiziološke uloge kalcijuma u organizmu su sledeće:

- hormonska – kalcijum kao intracelularni sekundarni glasnik.
- neuromuskularna – kontroliše ekscitabilnost, oslobađanje neurotransmitera i inicijacija kontrakcije mišića,
- enzimska – kalcijum kao koenzim faktora koagulacije krvi i
- strukturna – kalcijum ulazi u sastav kosti, hrskavica i zuba,

1. Razlika intra- i ekstracelularne koncnetracije kalcijuma daje ćeliji mogućnost da koristi kalcijum kao okidač – naglo povećanje citosolne koncentracije kalcijuma može se koristiti kao signalizirajući proces.



Slika 2.4. Uloga kalcijuma u ćeliji i ćelijskoj signalizaciji

Intracelularna koncentracija kalcijuma se povećava ulaskom kalcijuma iz ekstracelularnog prostora preko membranskih kalcijumovih kanala.

2. Sinapse su funkcionalne veze između neurona ili neurona i efektornih ćelija. Uloga kalcijuma u oslobađanju neurotransmitera se odvija u sledećim etapama:

3. Zgrušavanje krvi se može aktivirati spoljašnjim i unutrašnjim sistemom koagulacije. Spoljašnji put aktivacije zgrušavanja krvi započinje povredom zida krvnog suda usled čega se oslobađa tkvini tromboplastin (faktor III) koji se vezuje sa faktorom VII aktivira ga i u njegovom prisustvu zajedno sa jonima kalcijuma (faktor IV) aktivira faktor X.

4. Kosti i zubi kod sisara i košljoriba se baziraju na kalcijumfosfatu u formi hidroksiapatita $[Ca_5(PO_4)_3OH]_2$, obično udruženog sa oko 5% karbonata. Kosti endoskeleta, dentin i enamel zuba imaju visok sasatav minerala karbonatnog apatita. Mineralanu fazu kostiju čini ~43% zapremine i uglavnom se sastoji od kalcijuma i fosfata sa malim dodatkom karbonata. Mineral kostiju nije hidroksiapatit, već se može nazvati karbonizovani apatit. Unutar skeleta sisara, mineralizacija kostiju zavisi od organizacije umreženih kolagena. Na početku, voda ispunjava prazan prostor organskog okvira kolagenskog matriksa. Kristalna nukleacija odigrava se na početku na više nezavisnih mesta unutar kolagenskih vlakana kao i na površini fibrila. Mineralizacija nastavlja dalje do zona između kolagenskih molekula, zamenjujući molekule vode, da bi završila sa bezvodnom kosti. Ova rezidualna voda može da stabilizuje kolagen preko građenja inter i intra molekulskih veza sa hidrofilnim ostatcima, kao što je hidroksilna grupa hidroksiprolina i sl. Enamel kod zuba sisara je više mineralizovan nego kosti, što ga čini čvršćim.

Poređenje kalcijuma i magnezijuma. Razlike u strukturi, termodinamičkoj stabilnosti i brzini reakcija potiču od razlike u njihovom jonskom poluprečniku (Mg $0{,}6 \cdot 10^{-10}$ m; Ca $0{,}95 \cdot 10^{-10}$ m) izmerenog u oktaedarskom kiseonik donorskom okruženju. Mg^{2+} jon je isključivo oktaedaski koordinisan sa dužinom veze Mg-O od oko $2{,}05 \cdot 10^{-10}$ m, dok veći Ca^{2+} jon, slično Na^+ i K^+ može imati iregularnu koordinacionu geometriju; uglovi veza, dužina veze i koordinacioni broj variraju (7-10) sa dužinom veze Ca-O između $2{,}3\text{-}2{,}8 \cdot 10^{-10}$ m. U slučaju manjeg Mg centralno polje katjona dominira koordinacionom sferom, dok kod većeg katjona druga i moguće čak i treća koordinaciona sfera imaju veći uticaj na iregularnost struktura. Ovo takođe omogućava kalcijumu, za razliku od magnezijuma, da vezuje veći broj centara odjednom. Dalje, kinetike vezivanja molekula vode se dosta razlikuju, kod kalcijuma je

brzina razmene gotovo jednaka brzini sudara, za razliku od magnezijuma gde je brzina veoma spora [Crichton, 2008].

2.2.1.3. Stroncijum

Stroncijum je relativno rasprostranjen element i nalazi se na petnestom mestu po prisutnosti u Zemljinoj kori. Najčešće prisutan mineral je celestit – stroncijum sulfat $SrSO_4$ i stroncijum karbonat $SrCO_3$. Stoncium i stroncianit su dobili ime po selu Strontian u Škotskoj, pored koga je mineral prvi put otktiven. ^{90}Sr izotop je prisutan u proizvodima radioaktivnog raspada.

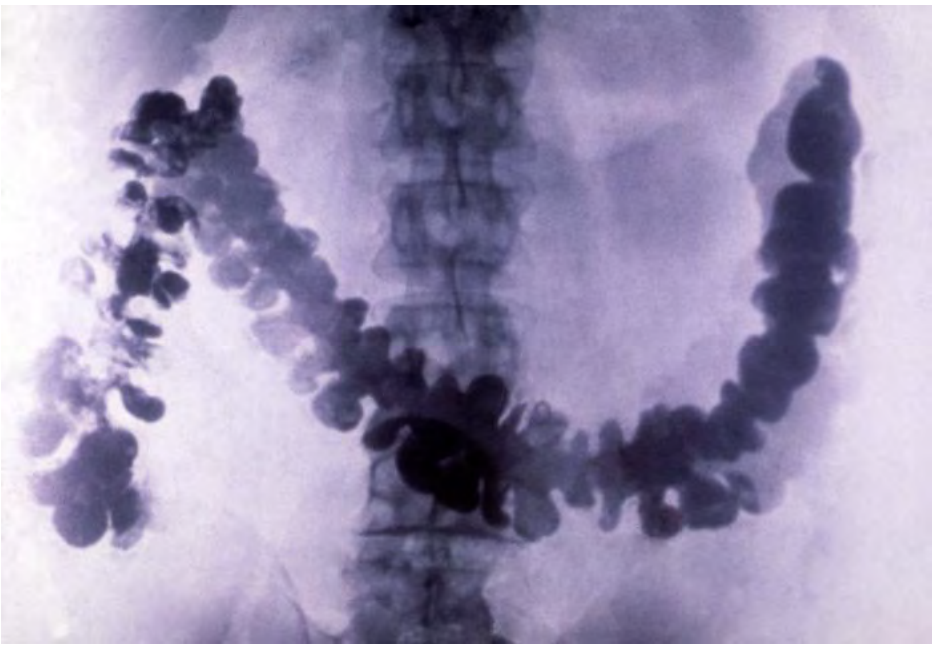
U ljudskom organizmu se normalno ne nalaze značajne količine stroncijuma, a ljudsko telo apsorbuje stroncijum kao da je kalcijum. Zbog hemijske sličnosti, stabilna jedinjenja stroncijuma ne predstavljaju značajnu opasnost po zdravlje – čak nivo stoncijuma koji se nalazi u prirodi može imati i korisne efekte po zdravlje. Lek stroncijum ranelat, napravljen kombinacijom stroncijuma sa raneličnom kiselinom, poboljšava rast kostiju i povećava gustinu kostiju. Polovina povećanja gustine (merene X-ray densitometrom) je povezana sa većom atomskom masom stroncijuma u poređenju sa kalcijum, a druga polovina je zaista povećana masa kostiju. Problem je u radioaktivnom ^{90}Sr koji dovodi do različitih koštanih poremećaja i oboljenja, uključujući i rak kostiju. Veće količine stroncijuma su toksične za ljudski organizam. U istraživanjima je utvrđen LD_{50} za bele miševe i on iznosi 147,6 mg/kg [Syed & Hosain, 1972].

U naučnim istraživanjima stroncijum se koristi u ispitivanju oslobađanja neurotransimetera u mozgu. Kao kalcijum, stroncijum olakšava fuziju sinaptičkih vezikula sa sinaptičkom membranom. Međutim, za razliku od kalcijuma, stroncijum izaziva asinhrono vezivanje vezikula. Iz tog razloga, zamena stroncijuma kalcijumom omogućava naučnicima da izmere efekat fuzije jedne vezikule, npr. veličina postsinaptičkog odgovora dobijenog neurotransmiternim sadržajem jedne vezikule.

2.2.1.4. Barijum

Barijuma ima 0,0425% u Zemljinoj kori i 13 μg dm^{-3} u morskoj vodi. Najuobičajniji minerali u prirodi su ona jedinjenja koja su najnerastvornija u vodi, a to su barit- barijum sulfat $BaSO_4$ i viterit- barijum karbonat $BaCO_3$. Barijum je ime dobio od grčke reči *barys* (βαρύς), što znači težak, što je u vezi sa velikom gustinom uobičajnih barijumovih ruda.

Zbog vrlo slabe rastvorljivosti u vodi i želudačnoj kiselini, barijum sulfat se može uzimati oralno. On se kompletno eliminiše iz digestivnog trakta. Na tome se bazira njegova primena u rentgenografiji u kojoj se koristi kao kontrasni agens jer bolje apsorbuje rentgenske zrake od mekih tkiva (slika 2.6.). Za razliku od drugih teških metala, on se ne bioakumulira. Međutim, inhalirana prašina koja sadrži jedinjenja barijuma može da se akumulira u plućima i da izazove benigno stanje pod imenom baritoza.



Slika 2.6. Radiografski snimak kolona popunjenog barijumsulfatom.

Rastvorna jedinjenja barijuma su otrovna. Pri malim dozama, barijum deluje kao mišićni stimulans, dok pri većim dozama deluje na nervni sistem izazivajući srčane smetnje, tremor, slabost, anksioznost, otežano disanje i paralizu. Ovi efekti mogu biti povezani sa njegovom sposobnošću da blokira kanale jona kalijuma koji su kritični za pravilno funkcionisanje nervnog sistema [Nordberg *et al.*, 2007]. U istraživanjima je utvrđen LD_{50} za bele miševe i on iznosi 19,2 mg kg^{-1} [Syed & Hosain, 1972].

2.2.2. Cink

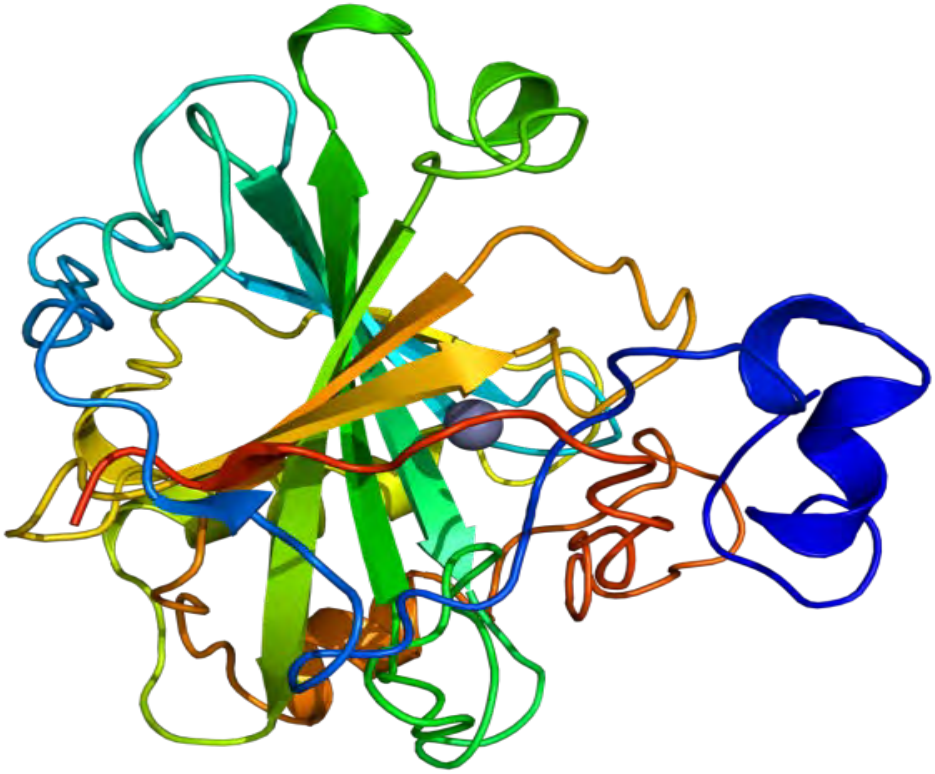
Cink je znatno manje prisutan od magnezijuma i kalcijuma u Zemljinoj kori i nalazi se na 24. mestu. Najčešća ruda cinka je sfalerit, mineral cink sulfid. U mnogim aspektima cink je po hemijskim karakteristikama sličan magnezijumu, iz razloga zato što su im joni slične veličine i oba elementa se u jedinjenjima nalaze u +2 oksidacionom stanju. Značajnije namirnice biljnog porekla koje sadrže zink su (mg kg^{-1}): kukuruz 30, pasulj 35, kupus 22, paradajz 20, krompir 18, zelena salata 55, šargarepa 24, repa 35, luk 25 [Kobata-Pendias & Mukherjee, 2007].

Cink je esencijalni mikro element, neophodan za biljke, životinje i mikroorganizme. Cink se nalazi u preko 100 enzima. Joni cinka imaju strukturnu ulogu u transkripcionim faktorima i skladište se i prenose preko matalotioneina. Posle gvožđa, cink je najprisutniji prelazni metal u u organizmu i jedini metal koji se javlja u svim klasama enzima. U proteinima, Zn(II) joni su često koordinisani sa amino kiselinama: asparaginska kiselina, glutaminska kiselina, cistein i histidin.

U ljudskom organizmu se nalazi između 2 i 4 g cinka. Najveći deo cinka se nalazi u mozgu, mišićima, kostima, bubrezima i jetri. Najveća koncentracija Zn(II) jona je u prostati i u delovima oka. U ljudskom organizmu je sveprisutan element. On interaguje sa velikim brojem različitih po strukturi organskih liganda, ima ulogu u metabolizmu RNK i DNK, u provođenju signala i ekspresiji gena. Takođe, Zn(II) jon reguliše apoptozu.

U mozgu, cink se skladišti u specifičnim sinaptičkim vezikulama preko glutamateričnog neurona. Cink kontroliše moždanu razdražljivost. On ima glavnu ulogu u sinaptičkoj plastičnosti i u procesu učenja. Sa druge strane cink može biti i neurotoksin, što nagoveštava da homeostaza cinka ima značajnu ulogu u normalnom funkcionisanju mozga i centralnog nervnog sistema.

Jon cinka je efikasna Luisova kiselina, što ga čini korisnim katalitičkim agensom u hidroksilaciji i sličnim enzimskim reakcijama. Cinkov jon takođe ima fleksibilnu koordinacionu geometriju, koja omogućava proteinu da brzo menja konformaciju u toku bioloških reakcija. Dva primera su ugljena anhidraza i karboksi peptidaza, koje su od vitalnog značaja u procesu regulacije nivoa CO_2 u krvi i u procesima varenje proteina.



Slika 2.7. Ugljena anhidraza II čoveka, jon cinka je prikazan u centru.

U krvi kičmenjaka ugljena anhidraza pretvara CO_2 u bikarbonat i isti enzim pretvara bikarbonat u CO_2 prilikom izdisanja vazduha preko pluća. Bez ovog enzima transformacija bi se odigravala milion puta sporije i normalna pH vrednost krvi bi od 7 morala da poraste na 10. Karboksipeptidaze razgrađuju peptide u procesu varenja proteina. Koordinatno kovalentna veza se formira između krajnjeg peptida i C=O, grupa se vezuje sa cinkom na taj način čineći ugljenik pozitivno naeletrisanim. Ovo pomaže da se formira hidrofobni džep u enzimu u blizini cinka koji povezuje nepolarne delove proteina.

Cink ima čisto gradivnu ulogu u "cinkovim prstima", gde uvija i klasteruje protein. "Cinkovi prsti" formiraju delove nekih transkripcionih faktora, proteina koji prepoznaju sekvence DNK prilikom procesa replikacije i transkripcije DNK. Svaki od devet ili deset Zn(II) jona omogućava da se održi struktura prsta preko koordinisanja sa četri amino kiseline u transkripcionom faktoru. Transkripcioni faktor se obmotava oko DNA heliksa i koristi svoje "prste" da se precizno veže sa DNA sekvencom [Crichton, 2008].

2.2.3. Olovo

U prirodi se olovo pretežno nalazi u obliku sulfida, karbonata i minerala galenita (PbS), cerusita i anglezita. Često se javlja u rudama zajedno sa cinkom. Prosečne koncentracije olova u zemljištu su između 15 i 25 mg kg^{-1}. Olovo se kao zagađivač može detektovati u svim delovima životne sredine i biološkim sistemima.

Proizvodi sagorevanja u metalurgiji i hemijskoj industriji, saobraćaj, industrijske otpadne vode i deponije su glavni izvori zagađenja olovom. Radnici u topionicama i livnicama olova, industriji boja, keramičkoj i industriji proizvodnje i obrade stakla, u industriji baterija i akumulatora, fabrikama oružja i municije su najviše izloženi olovu. Iz atmosfere, zemljišta, voda (površinskih i podzemnih), olovo se unosi i zadržava u biljkama, a dalje preko lanca ishrane i vode za piće dospeva i u ljudski organizam. Putevi unosa olova su vrlo različiti. Osim preko hrane i vode za piće, olovo se može uneti i preko vazduha zagađenog produktima sagorevanja fosilnih goriva, ambalaže za hranu koja je u nekoj fazi izrade bila u kontaktu sa ovim metalom [Goyer & Clasen, 1995].

Olovo je otrovna susptanca za životinje, uključujući i ljude. Ono oštećuje nervni sistem i izaziva moždane poremećaje. Povećano izaganje olovu izaziva poremećaje značajnih biohemijskih parametara krvi kod sisara [Nikolić R.S. *et al.*, 2013]. Kao i živa, olovo se lako akumulira u mekim tkivima i kostima. Utvrđena vrednost za LD_{50} kod miševa za tetrametil olovo iznosi 105 mg/kg [http://www.inchem.org].

Trovanje olovom (poznato i kao plumbizam, *colica Pictonum*, saturnizam) je medicinsko stanje kod ljudi i ostalih kičmenjaka izazvano povećanjem nivoa olova unutar organizma. Olovo utiče na veliki broj različitih procesa u telu i toksično je za većinu organa i tkiva koje uključuju srce, kosti, creva, bubrege, reproduktivne organe i centralni nervni sistem. Simptomi trovanja olovom uključuju bol u trbuhu, zbunjenost, glavobolju, anemiju, razdražljivost i u ozbiljnim slučajevima napade, komu i smrt [Nikolić R.S. *et al.*, 2011].

Simptomi akutnog trovanja olovom su bolovi u abdomenu, mučnina, gubitak apetita, zamor, nedostatak koncentracije, nesanica, halucinacije, vrtoglavica, glavobolja, promene raspoloženja, artritis. Smrt kod akutnog trovanja ljudi može nastupiti pri unosu od 25 do 30 g rastvorljivih soli olova. Hronična izloženost ovom teškom metalu dovodi do mentalne retardacije, psihoze, hiperaktivnosti, gubitak težine i mišićne slabosti i paralize. Povećano prisustvo ovog metala pripisuje se, u nekim slučajevima, i pojavi hipertenzije, srčane aritmije,

malignim promenama u digestivnom traktu, plućima, bubrezima [Counis & Torriglia, 1998]. Neurotropno delovanje olova se ispoljava i na centralni nervni sistem, što je poznato kao olovna encefalopatija ili olovna neuropatija. Dugotrajno izlaganje olovu dovodi i do reverzibilnih nefrotoksičnih efekata kao što je hronična bubrežna insuficijencija koja kasnije može dovesti i do gihta.

2.2.4. Kadmijum

Prosečna koncentracija kadmijuma u Zemljinoj kori je između 0,1 i 0,5 ppm. Kadmijum se javlja kao manje prisutna komponenta u većini cinkovih ruda i samim tim se dobija njihovom preradom. Kod viših organizama kadmijum nema nijednu korisnu ulogu. Naprotiv, kadmijum se smatra veoma toksičnim metalom. Kod miševa akutna doza iznosi LD_{50} = 890 mg kg^{-1} [ATSDR, 1999].

Kadmijum je jedna od šest supstanci koja je zabranjena direktivom Evropske unije (Restriction on Hazardous Substances - RoHS), koja zabranjuje otrovne supstance u električnim uređajima. Izlaganje ljudi kadmijumu iz okoline može biti posledica sagorevanja fosilnih goriva, upotrebe fosfatnih đubriva, proizvodnje gvožđa i čelika, proizvodnje cementa i putem otpadnih voda. Namirnice koje su uzgajane na zemljištu koje sadrži povećanu količinu kadmijuma takođe mogu biti izvor izlaganja kadmijuma.

Od svih načina izlaganja kadmijumu najopasnija je inhalacija fine prašine i isparenja kadmijuma, kao i oralno unošenje u vodi veoma rastvornih kadmijmovih jedinjenja. Inhalacija isparenja koja sadrže jedinjenja kadmijuma u kliničkoj slici rezultuje groznicom, pneumonitisom, plućnim edemom i smrću.

Pušenje predstavlja najveći izvor inhalacione intoksikacije kadmijumu [Nikolić R.S. *et al.*, 2011]. Preko duvanskog dima 50% kadmijuma se apsorbuje iz pluća u sistemsku cirkulaciju u toku aktivnog pušenja [Satarug *et al.*, 2003]. U proseku pušači imaju 4-5 puta višu koncentraciju kadmijuma u krvi i 2-3 puta višu koncenentraciju u bubrezima u odnosu na nepušače.

Akutno i hronično oštećenje tkiva i organa je posledica izloženosti kadmijumu [Sarkar *et al.*, 1995]. Nakon unošenja u organizam kadmijum se trasportuje preko krvi vezjujući se za albumin i u organizmu se akumulira u bubrezima i jetri. Visoki toksični efekat kadmijuma je rezultat njegove interakcije sa mikro i makroelementima, kao što su gvožđe, kalcijum, bakar i cink [Brzoska & Moniuszko-Jakoniuk, 1997]. Trovanje kadmijumom može biti akutno i

hronično. Akutno trovanje kadmijumom nastaje inhalacijom para ili čestica soli kadmijuma (oksida, hlorida, sulfide, sulfata, karbonata i acetata). Simptomi akutnog izlaganja kadmijumu su mučnina, povraćanje, gubitak mirisa, ukusa i apetita, abdominalni bol [Wentz, 2000].

Dugotrajno izlaganje kadmijumu inhalacijom ili oralnim putem može dovesti do hroničnog trovanja. Za razliku od akutne, hronična intoksikacija dovodi do razvoja nekih bolesti kao npr. hronične opstruktivne bolesti pluća, bolesti bubrega (nefrotoksičnost) i kostiju (artritis, osteoporoze), anemije, poremećaj rasta i drugih [ATSDR, 1999].

Akutno trovanje kadmijumom kod laboratorijskih životinja dovodi do oštećenja jetre i testisa, dok hronično izlaganje dovodi do oštećenja bubrega, anemije, poremećaja imuniteta i oštećenja kostiju [Waalkes, 2000].

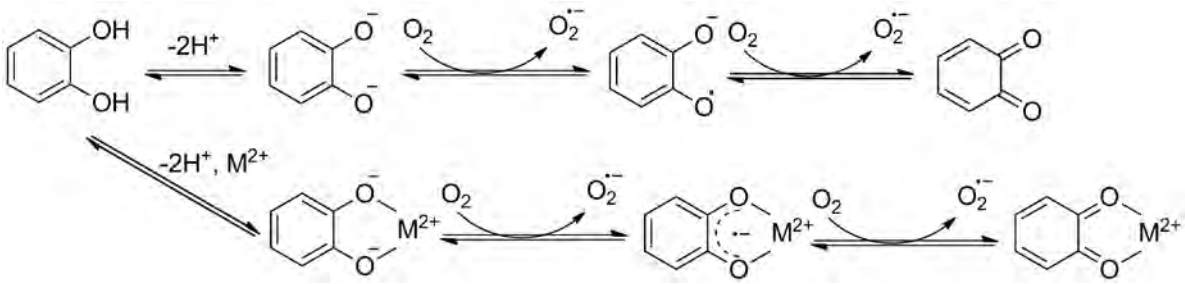
Iako kadmijum nije redoks-aktivan metal i ne može direktno učestvovati u Fentonovoj reakciji i u stvaranju kiseoničnih rektivnih vrsta, indirektnim mehanizmima dovodi do oksidativnog stresa i do daljih oštećenja struktura organizma. *In vivo* i *in vitro* ispitivanja su ukazala na indirektno dejstvo kadmijuma koje dovodi do produkcije slobodnih radikala i oksidativnog stresa svojim inhibitornim dejstvom na antioksidativni zaštitni sistem. Novijim ispitivanjima je pokazano da je kadmijum uzročnik oksidativnih oštećenja DNK, proteina i lipida, što je verovatno uticaj kadmijuma na enzimske i neenzimske komponente antioksidativnog sistema odbrane organizama [Jovanović *et al.*, 2013; Videla *et al.*, 2003].

2.3. Uticaj dvovalentnih dijamagnetnih metalnih jona na autooksidaciju polifenolnih jedinjenja

Dvovalentni dijamagnetni katjoni metala interaguju sa polifenolima pre svega gradeći odgovarajuća kompleksna jedinjenja i menjajući na taj način reaktivnost polifenola sa slobodnim radikalima i u kvalitatitvnom i kvantitativnom smilsu [Eaton, 1964]. Metalni joni koji imaju osobine Lewis-ovih kiselina utiču na brzinu reakcija transfera elektrona, najčešće je ubrzavajući, kada se metalni jon veže za radikal anjon. Aktivacija transfera elektrona igra vitalnu ulogu u biološkim redoks reakcijama, koje su neophodne za život, kao što je disanje. Procesi transfera elektrona u mnogim biološkim i hemijskim reakcijama su aktivirani preko nekovalentnih intereakcija. U ovom slučaju način vezivanja metalnog jona igra važnu ulogu u aktivaciji transfera elektrona, jer način vezivanja metalnog jona ima direktni uticaj na redoks potencijal supstrata i reorganizacionu energiju transfera elektrona, oba ključna parametra za brzinu reakcije. Pošto je biološka aktivnost metaloenizma obično povezana sa

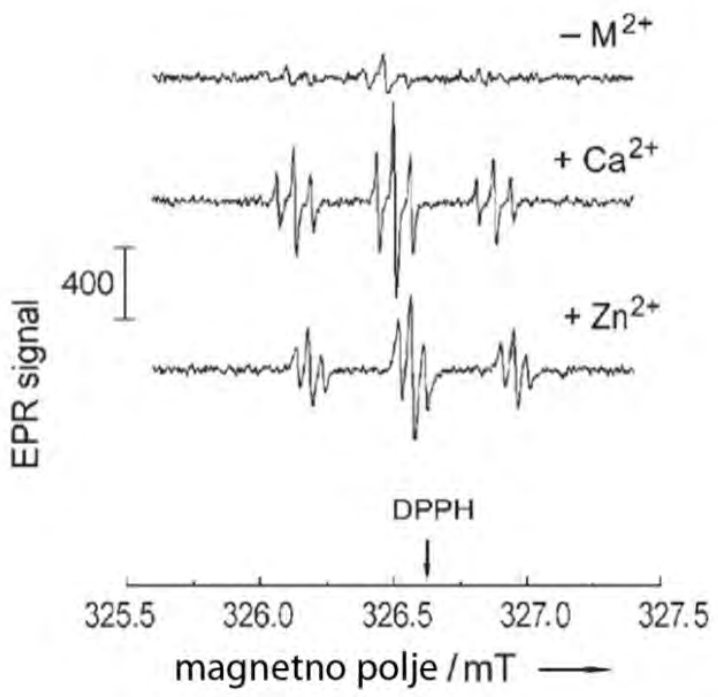
koordinacionim okruženjem aktivnog mesta sa metalnim jonom, način vezivanja metalnog jona u kompleksu ima esencijalnu ulogu u redoks funkciji metaloenzima. Sa druge strane vezujući se za ligand metalni jon utiče direktno na redoks osobine liganda uključujući i uticaj na slobodno radiklaske reakcije u kojima slobodni ligand učestvuje.

Pri fiziološkim uslovima, većina polifenola se lako oksiduje pomoću molekulskog kiseonika. Reakcije autooksidacije uključuju semihinone (SQ), hinone (QQ) i reaktivne kiseonične vrste (ROS). Sposobnost specifičnih interakcija sa metalnim jonima, M^{n+}, u metastabilnom redoks stanju je važna karakteristika polihidroksilnih fenolnih jedinjenja. Navedena interakcija se bazira na građenju kompleksa i karakteriše se intramolekuskim transferom elektrona, preko valencionog tautomerizma između metalnog jona i polihidroksilne osnove. Reakcija autooksidacije katehola, bez i u prisustvu dvovalentnog metalnog jona prikazana je na šemi 2.4.



Šema 2.4. Reakcija autooksidacije katehola, bez i u prisustvu dvovalentnog metalnog jona.

Za proučavanje strukture slobodnih radikala i njihovih interakcija sa metalnim jonima veoma je pogodna ESR spektroskopija. Slika 2.8. prikazuje ESR spektre semihinonskog radikala nastalog tokom autooksidacije katehola, bez i u prisustvu Ca(II) i Zn(II) jona. U rastvoru bez metalnih jona autooksidacija katehola daje slab ESR signal. Prisustvo Ca(II) i Zn(II) jona dovodi do povećanja amplitude signala i do pomeranja u *g*- vrednosti [Felix & Sealy, 1982].



Slika 2.8. ESR spektar snimljen tokom autooksidacije katehola, bez metalnog jona $–M^{2+}$, u prisustvu Ca^{2+} i Zn^{2+} jona na sobnoj temperaturi [Lebedev *et al.*, 2007].

Istraživanja pokazuju da je povećanje koncentracije radikala rezultat povećanja kinetičke stabilnosti kompleksiranog radikala. Sa druge strane pokazano je da je reverzna disproporcija semihinoskog radikala značajnija u prisustvu kompleksirajućih katjona. Studije vremenskog praćenja su pokazale da je spinska stabilizacija izraženija u prisustvu Zn(II) jona. Prisustvo kalcijumovih jona (kao i prisustvo ostalih dvovalentnih jona zemnoalkalnih metala) izaziva izraženo kratkotrajno povećanje amplitude ESR signala [Lebedev *et al.*, 2007].

Kalcijumovi joni imaju sposobnost da značajno povećavaju slabo kisele osobine katehola, što se manifestuje smanjenjem vrednosti pKa. Ovaj efekat doprinosi poboljšanoj deprotonizaciji katehola na nižim pH vrednostima. Dvostruko deprotonizovan katehol sadrži višak elektronske gustine što ga čini pogodnijim za autooksidaciju.

Literaturni podaci pokazuju da Zn(II) i Ca(II) joni imaju različit efekat na proces autooksidacije katehola [Lebedev *et al.*, 2007]. Objašnjenje leži u činjenici da se ovi joni razlikuju po broju elektrona, konfiguraciji, stepenu polarizabilnosti, što dovodi to toga da se Zn(II) joni vezuju za ligand katehin (Cat^{-2}) mnogo jače u odnosu na Ca(II) jone, što dalje čini [Ca^{2+}-Cat^{2-}] kompleks mnogo dostupnijim za oksidaciju u odnosu na [Zn^{2+}-Cat^{2-}] kompleks. Konstante stabilnosti kompleksa cinka sa fenolnim jedinjenjima su znatno više u odnosu na

odgovarajuće kalcijumove komplekse. Ovo povećanje u energiji interakcije unutar Zn(II) kompleksa čini da postoji delimična blokada kiseoničnih liganda i smanjenja mogućnost interakcije sa molekulskim kiseonikom. Kako Zn(II) jon inhibira potošnju kiseonika, u njegovom prisustvu ravnotežna koncentracija SQ je povećana.

Svi dvovalentni metalni joni imaju sposobnost da povećavaju koncentraciju semihinona i ovaj efekat se naziva spinska stabilizacija [Eaton, 1964]. Ovaj efekat je u najvećoj meri ispitivan kod različitih jedinjenja koje imaju dve vicinalne hidroksilne grupe na benzenovom prstenu (kateholna struktura u molekulu) kao što su sam katehol [Eaton, 1964], L-dopa [Lebedev *et al.*, 2007], katehol estrogeni [Kalyanaraman *et al.*, 1984], flavonoidi [van Acker *et al.*, 1996] i drugi slični molekuli koji imaju biološki ili farmakološki značaj [Kalyanaraman, 1990]. Efekat spinske stabilizacije je uočen i kod nekih trihidroksilnih fenolnih jedinjenja [Nikolić G.M *et al.*, 2011a,b] ali je u mnogo manjoj meri ispitivan.

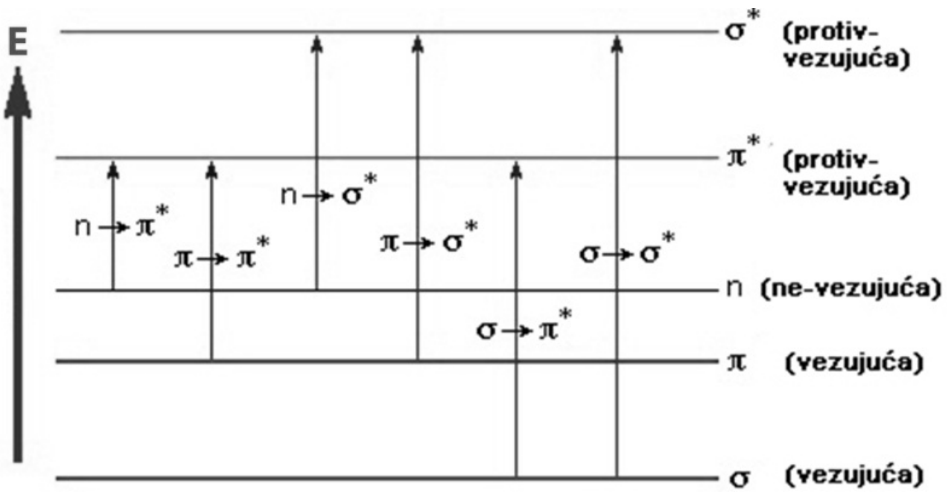
2.4. Metode i tehnike ispitivanja procesa autooksidacije

Za ispitivanje procesa autooksidacije mogu se koristiti različite metode i tehnike a kao posebno pogodne su se pokazale UV/Vis spektrofotometrija i ESR spektroskopija. U ovoj disertaciji su osim ovih tehnika korišćene i HPLC i masena spektrometrija. Radi dobijanja podataka o broju različitih hemijskih vrsta u ispitivanim sistemima, kinetičkog profila reakcija primenjivane su različite hemometrijske metode obrade spektralnih podataka.

2.4.1. UV/Vis spektrofotometrija

Ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija ili ultraljubičasta-vidljiva spektrofotometrija (UV-Vis ili UV/Vis) predstavlja apsorpcionu spektroskopiju u elektromagnetnom delu spektra između 200 i 800 nm. U UV/Vis delu elektromagnetnog spektra nalazi se energija koja izaziva elektronske prelaze unutar molekula i ovom tehnikom se može detektovati prelaz iz osnovnog u pobuđeno stanje.

Na slici 2.9. prikazani su različiti elektronski prelazi iz osnovnog u pobuđeno stanje koji se mogu odigrati u organskom molekulu. Samo dva prelaza sa najnižom enegrijom su moguća u delu spektra od 200 do 800 nm ($n \rightarrow \pi^*$ i $\pi \rightarrow \pi^*$).



Slika 2.9. Energetski dijagram elektronskih prelaza u organskim molekulima.

Po pravilu, energetski favorizovan prelaz elektrona biće sa najviše popunjene molekulske orbitale (highest occupied molecular orbital – HOMO) na najnižu nepopunjenu molekulsku orbitalu (lowest unoccupied molecular orbital – LUMO).

Hemijske vrste koje apsorbuju u oblasti od 200 do 800 nm daju karakteristične UV/Vis spektre sa jednom ili više apsorpcionih traka. Osnovne karakteristike svake apsorpcione trake su apsorpcioni maksimum (λ_{max}) sa odgovarajućim molarnim apsorpcionim koeficijentom (ε), širina i intezitet apsorpcione trake. Ovi parametri daju informacije o grupi atoma (hromofora) koje apsorbuju foton i navedene informacije se mogu upotrebiti za karakterizaciju molekula. Takođe dobijene informacije se mogu upotrebiti za kvantitativnu karakterizaciju sistema [Perkampus, 1992]. UV/Vis spektroskopija se rutinski koristi u analitičkoj hemiji za kvantitativno određivanje različitih analita, kao što su joni prelaznih metala, organski molekuli i biološki makromolekuli [Giinzler & Williams, 2001]. Polifenolna jedinjenja i većina autooksidacionih proizvoda apsorbuje u UV/Vis oblasti, što ih čini pogodnim za ispitivanje UV/Vis ovom tehnikom [Beltrán *et al.*, 2003].

2.4.1.1. Grafička metoda za određivanje broja čestica u rastvoru korišćenjem spektrofotometrijskih podataka

Spektrofotometrija se često koristi radi utvrđivanja interakcija između supstanci u rastvoru kada je neophodno da se utvrdi broj čestica koje apsorbuju. U tu svrhu se često koriste jednostavne ali efikasne metode grafičke analize spektrofotometrijskih podataka. Podaci o broju čestica u sistemu imaju važnu ulogu u kinetičkim studijama ili prilikom određivanja konstanti formiranja kompleksnih jedinjenja. Jedan od jednostavnijih načina obrade

spektrofotometrijskih podataka je matrična analiza sa grafičkim prikazom [Coleman *et al.*, 1970].

Rang matrice (R) se definiše kao red najveće ne nulte determinante koja se može dobiti iz elemenata matrice. Pošto je vrednost determinante nula ako su redovi ili kolone linearno zavinsi, rang matrice daje broj linearno nezavisnih elemenata matrice; za matricu apsorbance ovo je broj aposorbujućih čestica u rastvoru. Ako matrica $||A_{ij}||$ poseduje rang R, gde je R broj nezavisnih aposrbujućih čestica, onda svaka determinanta $|A_{ij}|$ koja ima rang R+1 mora da nestane. Kada je R = 1 onda važi jednačina 2.26.1., ne samo za prikazane elemente već i kada se u drugoj koloni vrednosti A_{13} i A_{23} zamene apsorbancom na istoj talasnoj dužini (A_{14} i A_{24}) za bilo koji drugi rastvor u seriji.

$$\begin{vmatrix} A_{11} & A_{12} \\ A_{21} & A_{22} \end{vmatrix} = 0 \qquad (2.26.1.)$$

Jednačina 2.24.1. se može interpetirati kao serija tačaka sa (x, y) koordinatama (A_{11}, A_{21}), (A_{12}, A_{22}) ili generalno prikazano (A_{1i}, A_{2j}) gde se indeksi 1 i 2 odnose na talasne dužine apsorbanci A, a i i j se odnose na određeni rastvor. Uslov da je determinanta jednaka nuli ispunjen je ako se ove tačke (x, y) nalaze na pravoj liniji koja prolazi kroz koordinatni početak. Drugim rečima, kada se apsorbanca na jednoj talasnoj dužini grafički prikaže u odnosu na apsorbancu na drugoj talasnoj dužini, dobija se set linija koje polaze iz jedne tačke kada u rastvoru postoji samo jedna apsorbujuća vrsta.

Kada je R = 2, onda za svaku 3×3 detreminatu važi jednačina 2.26.2. u kojoj je svaka kolona podeljena sa svojim prvim elementom.

$$\begin{vmatrix} 1 & 1 & 1 \\ A_{21}/A_{11} & A_{22}/A_{12} & A_{23}/A_{13} \\ A_{31}/A_{11} & A_{32}/A_{12} & A_{33}/A_{13} \end{vmatrix} = 0 \qquad (2.26.2.)$$

Ako je ispunjen uslov dat jednačinom 2.26.2. onda će se tri tačke sa (x, y) koordinatama (A_{21}/A_{11}, A_{31}/A_{11}), (A_{22}/A_{12}, A_{32}/A_{12}) i (A_{23}/A_{13}, A_{33}/A_{13}) nalaziti na jednoj pravoj liniji. Na istoj liniji će se naći i tačke (A_{2j}/A_{1j}, A_{3j}/A_{1j}) koje odgovaraju apsorbancama za bilo koji drugi rastvor iz iste serije Prema tome, grafički prikaz odnosa apsorbanci koje uključuju tri različite talasne dužine predstavlja test za identifikaciju sepektara koji potiču od dve apsorbujuće čestice.

Kada je R = 3 onda za svaku 4 x4 determinatu važi jednačina 2.26.3.

$$\begin{vmatrix} 1 & 1 & 1 & 1 \\ A_{21}/A_{11} & A_{22}/A_{12} & A_{23}/A_{13} & A_{24}/A_{14} \\ A_{31}/A_{11} & A_{32}/A_{12} & A_{33}/A_{13} & A_{34}/A_{14} \\ A_{41}/A_{11} & A_{44}/A_{12} & A_{43}/A_{13} & A_{44}/A_{14} \end{vmatrix} = 0 \qquad (2.26.3.)$$

Determinanta trećeg reda rezultuje iz oduzimanja prve kolone sa svakom drugom i nakon toga širenjem duž prvog reda (koji sada sadrži tri nule). Deljenjem svakog reda determinante trećeg reda sa poslednjim elementom dobija se:

$$\begin{vmatrix} \frac{A_{11}A_{22}-A_{12}A_{21}}{A_{11}A_{24}-A_{14}A_{21}} \times \frac{A_{14}}{A_{12}} & \frac{A_{11}A_{23}-A_{13}A_{21}}{A_{11}A_{24}-A_{14}A_{21}} \times \frac{A_{14}}{A_{13}} & 1 \\ \frac{A_{11}A_{32}-A_{12}A_{31}}{A_{11}A_{34}-A_{14}A_{31}} \times \frac{A_{14}}{A_{12}} & \frac{A_{11}A_{33}-A_{13}A_{31}}{A_{11}A_{34}-A_{14}A_{31}} \times \frac{A_{14}}{A_{13}} & 1 \\ \frac{A_{11}A_{42}-A_{12}A_{41}}{A_{11}A_{44}-A_{14}A_{41}} \times \frac{A_{14}}{A_{12}} & \frac{A_{11}A_{43}-A_{13}A_{41}}{A_{11}A_{44}-A_{14}A_{41}} \times \frac{A_{14}}{A_{13}} & 1 \end{vmatrix} = 0 \qquad (2.26.4.)$$

Tačke sa koordinatama (x, y) dobijene od prvog i drugog elementa u svakom redu se nalaze na jednoj pravoj liniji. Pošto sve vrednosti x sadrže član A_{14}/A_{12} a sve vrednosti y imaju član A_{14}/A_{13} pojednostavljeni elementi prikazani su determinantom u jednačini 2.26.4. Grafički prikaz odgovarajućih vredonsti predstavlja skup linija koje se razlikuju samo po nagibu i odgovara sistemu sa tri apsorbujuće čestice.

$$\begin{vmatrix} \frac{(A_{11}A_{22}-A_{12}A_{21})}{(A_{11}A_{24}-A_{14}A_{21})} & \frac{(A_{11}A_{23}-A_{13}A_{21})}{(A_{11}A_{24}-A_{14}A_{21})} & 1 \\ \frac{(A_{11}A_{32}-A_{12}A_{31})}{(A_{11}A_{34}-A_{14}A_{31})} & \frac{(A_{11}A_{33}-A_{13}A_{31})}{(A_{11}A_{34}-A_{14}A_{31})} & 1 \\ \frac{(A_{11}A_{42}-A_{12}A_{41})}{(A_{11}A_{44}-A_{14}A_{41})} & \frac{(A_{11}A_{43}-A_{13}A_{41})}{(A_{11}A_{44}-A_{14}A_{41})} & 1 \end{vmatrix} = 0 \qquad (2.26.5.)$$

Uslov za korišćenje ovih testova je da se rastvori pokoravaju Lambert-Beerovim zakonu. Postoje dva uobičajna razloga za odstupanje od ovog zakona: 1) koncentracija rastvorene supstance prevazilazi solvatacionu sposobnost rastvarača, 2) formiranje kompleksnih jedinjanja sa prenosom naelektrisanja.

Pošto postoji veliki broj kombinacja talasnih dužina iz seta podataka, broj kombinacija koji se uzima u obzir je takav da se maksimizira promena u apsorbanci: (a) za jednu česticu vrednosti A_{mj} u odnosu na A_{ij}, $i \neq m$ ili n, (b) za dve čestice vredosti A_{mj}/A_{nj} vs. A_{ij}/A_{nj} $i \neq m$, (c) za tri čestice $(A_{mx}/A_{iy} - A_{my}/A_{ix})/(A_{mx}/A_{iz} - A_{mz}/A_{ix})$ vs. $(A_{mx}/A_{ij} - A_{mj}/A_{ix})/(A_{mx}/A_{iz} - A_{mz}/A_{ix})$, $i \neq m$, $j \neq x$, y, ili z.

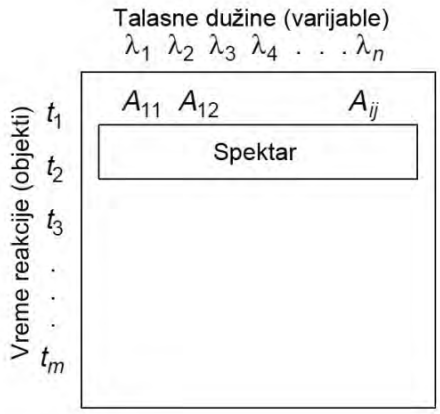
Kada se stehiometrijska ograničenja odnose na sastav serije rastvora tumačenje podataka u vezi apsorbance se odvija preko definisanih ograničenja. Postoje dva tipa ograničenja koja se

uzimaju u obzir-jedna podrazumeva da je suma svih koncentracija apsorbujućih čestica konstantna, a druga da je suma koncentracija reagujućih čestica konstantna (Jobova metoda) [Coleman *et al.*, 1970].

2.4.1.2. MCR-ALS

Analiza multikomponetnog dinamičkog sistema radi analize eksperimentalnih podataka koji sadrže više promenljivih često zahteva primenu metoda koje se baziraju na razdvajanju nezavisnih komponenti. Da bi okaraterisali višekomponentni sistem neophodno je da se analitički signali snime na način pogodan za dalju hemometrijsku analizu. Ovo se postiže tako što svi podaci formiraju tabelu ili matricu gde se jedan smer ("elution" ili smer procesa) odnosi na promene komponentnosti sistema, a drugi smer se odnosi na varijaciju snimljenog analitičkog odgovora (signala) (slika 2.10.). Postojanje ova dva pravca varijacija omogućava da se odredi doprinos pojedinačnih komponenti [Tauler, 1995].

Komponenta se može okarakterisati kao entitet koji je sposoban da daje jasan i realan analitički odgovor – odziv. Kao najznačajniji primeri multikomponetnih sistema mogu se izdvojiti procesi i miksture (smeše). Termin proces se odnosi na sve čestice koje učestvuju u određenoj hemijskoj reakciji. Promene u sastavu sistema mogu se pripisati definisanim promenama i ako je moguće i fizičko-hemijskom modelu na kome se reakcija bazira. Mešavine mogu imati u potpunosti slučajne promene u smeru komponentnog pravca u odnosu na zastupljenost pojedinih komponenti. Kao primer mogu se uzeti spektari snimljeni za nezavisne multikomponentne uzorake. U nekim slučajevima setovi podataka se mogu naći između ova dva ekstrema.



Slika 2.10. Primer multivarijantnog seta podataka za spektrometrijsko praćenje kinetičkog procesa. *Aij* je apsorbanca snimljena za i-to vreme reakcije i za j-tu talasnu dužinu.

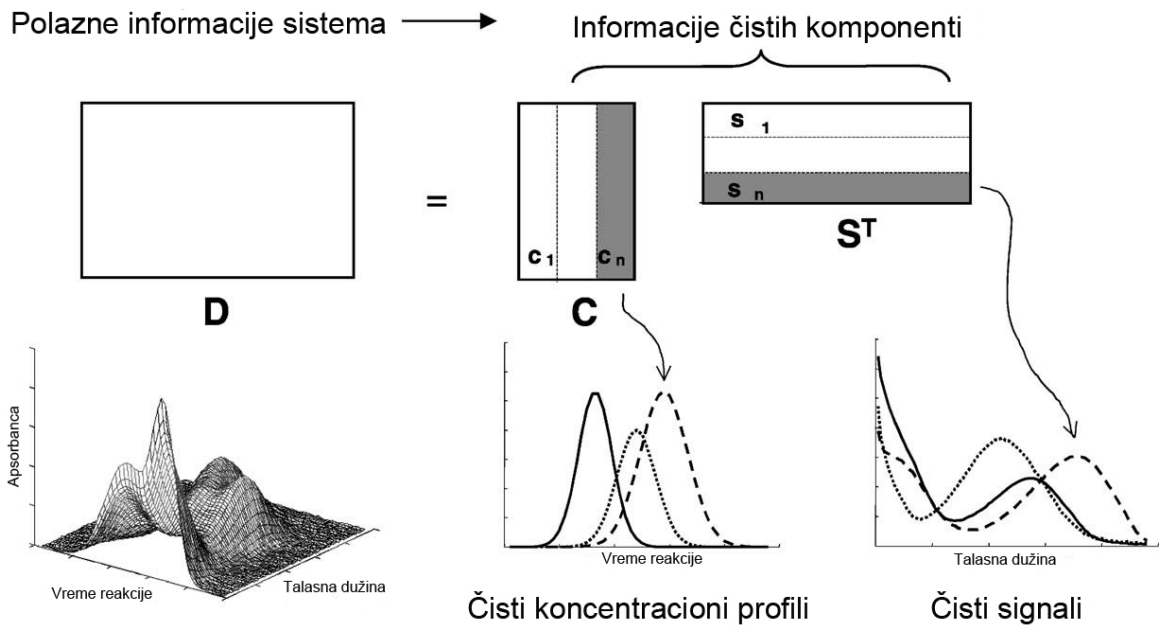
Prilikom analize multikomponentnih sistema glavni cilj je transformacija prikupljenih eksperimentalnih podataka u korisne informacije o samom sistemu. Celokupna promena merenih varijacija hemijskih podataka se transformiše u jasan opis doprinosa svake komponente unutar mešavine ili procesa. Bez obzira na različitost prirode multikomponentnih sistema, varijacije u njihovim odgovarajućim eksperimentalim parametrima u većini slučajeva se mogu predstaviti kao jednostavni čisti linearni modeli zavisni od sastava, pri čemu doprinosu jedne komponente odgvovara jedan član. Iako se ovakav model često prati, zbog prirode instrumentalnih merenja informacije o doprinosu pojedinačnih komponenti ne mogu se odrediti na jednostavan način iz prikupljenih podataka. Zajednički cilj svih multivarijantnih rezolucionih metoda je prevazilaženje ovog problema određivanjem linearnog modela individualnog doprinosa svake komponente korišćenjem samo eksperimentalnih podataka bez potrebe da se unapred poznaju pojedinačne komponente. Jedini neophodan uslov je unutrašnja linearnost podataka. Bilo koja informacija koja se tiče sistema ako postoji može se koristiti, ali nije neophodna. Mala zahtevnost u pogledu detaljnog poznavanja sistema omogućava primenu multivarijantnih metoda za rešavanje mnogih hemijskih problema bez potrebe da se vrše dodatna merenja ili primenjuju druge metode za analizu sistema [Beebe *et al.*, 1998]

Sve rezolucione metode vrše matematičko razlaganje jedinstvenog instrumentalnog odziva na doprinose pojedinačnih komponenti u sistemu. Jedinstveni odziv je organizovan u matricu $\boldsymbol{D}$ koja sadrži odgovarajući set podataka i koja sadrži dobijene informacije o svim komponentama. Rezolucione metode omogućavaju da se razlaganjem inicijalnog skupa podataka unutar matrice $\boldsymbol{D}$, stvori dve matrice podataka $\boldsymbol{C}$ i $\boldsymbol{S}^{\mathbf{T}}$ gde svaka od njih predstavlja čist odziv pojedinačnih n profila komponenti u mešavini ili procesu, a koji se povezuje sa redom i kolonom direktno u polaznoj matrici $\boldsymbol{D}$ [Garrido *et al.*, 2008; Nia *et al.*, 2011; Tauler, 1995]. Matematički, preko matrične notacije, opšta jednačina za sve rezolucione metode je:

$$\boldsymbol{D} = \boldsymbol{C}\boldsymbol{S}^{\mathbf{T}} + \boldsymbol{E} \qquad (2.27.1.)$$

Kod primene ovih metoda na spektroskopska merenja eksperimentalni spektri snimeljeni u različitim vremenskim intervalima su organizovani kao kolone unutar matrice $\boldsymbol{D}$. Kolone unutar matrice $\boldsymbol{C}$ i redovi unutar matrice $\boldsymbol{S}^{\mathbf{T}}$ se povezuju sa koncentracionim profilima i spektrima čistih komponenti. Superskript T znači da je matrica S transponovana. E je matrica

ostatka, deo podataka koje model nije uspeo da objasni i najčešće se povezuje sa eksperimentalnom greškom. Jednačina 2.27.1. je ekstenzija Lambert–Beer-ovog zakona za više talasnih dužina, definisanog u matričnoj formi.



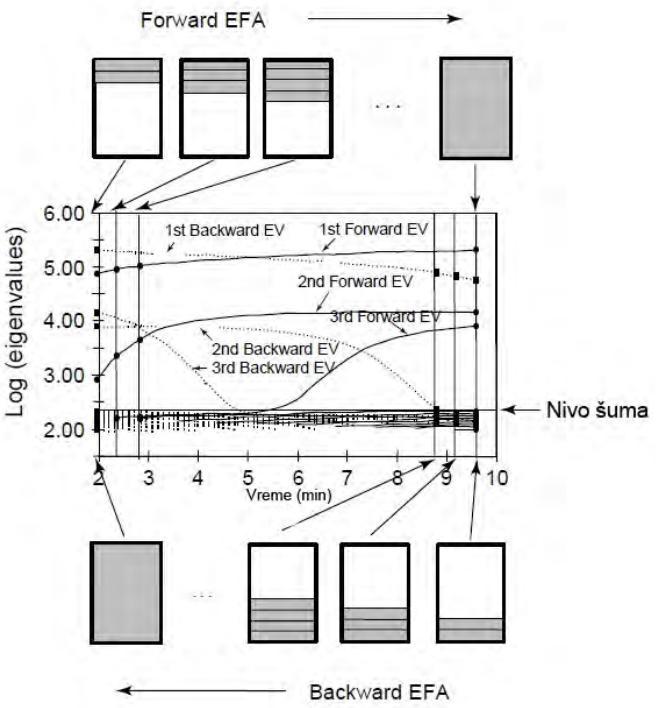
Slika 2.11. Šematski i grafički prikaz polaznog seta podataka, primena dekompozicionih metoda i prikaz dobijenih informacija.

Jedna od atraktivnih karakteristika rezolucionih metoda je da nije neophodno predznanje, kako hemijsko tako ni matematičko, da bi se analizirao set podataka. Međutim, preliminarne informacije o ispitivanom sistemu mogu pozitivno da doprinesu određivanju učešća pojedinačnih komponenti.

Mnoge preliminarne procedure i metode proizilaze iz analize osnovnih komponenti (eng. Principal Component Analysis, PCA), jedne od osnovnih i najkorišćenjijih hemometrijskih metoda primenljivanih za određivanje broja i smera relevantnih izvora varijacije u bilinearnom setu podataka. Informacije dobijene primenom PCA na ceo skup podataka mogu se iskoristiti u cilju daljeg definisanja početnih parametara. Iz tog razloga, prvi korak u većini rezolucionih metoda je određivanje ukupnog broja komponenti u setu podataka primenom razdvajanja po jedinstvenim vredostima (eng. Singular Value Decomposition, SVD) [Golub & Van Loan, 1989]. Nedvosmislenost zavisi od distribucije i preklapanja doprinosa komponenti unutar seta podataka. Pored SVD za polazne procene može se koristiti iselektovanje čistih varijabli [Sanchez *et al.*, 1996; Windig & Guliment, 1991]. Takođe, primenljiva metoda je i analiza nastajućih faktora (eng. Evolving Factor Analysis, EFA)

[Gampp *et al.*, 1987]. Ova analiza se obavlja konstuisanjem grafika od početka do kraja procesa (analiza unapred EFA, "forward" EFA) ili u suprotnom pravcu (analiza unazad EFA, "backward" EFA). EFA metoda proračunava svojstvene vrednosti (*eigenvalue*) dobijene iz PCA za submatricu koja postepeno raste, a koja je dobijena iz osnovnog seta podataka ***D***(m×n). PCA se izvršava sukcesivno više puta u submatricama koje se stvaraju preko povećanja veličine predhodne matrice za jedan red. Povećaje veličine matrice se koristi i kod EFA analize unapred i unazad.

Ovo se vrši tako što se kod analize unapred EFA prvo izvrši PCA analiza redova 1 i 2, nakon toga redova 1, 2 i 3 i tako do finalne PCA analize m redova celokupnog seta podataka. EFA analiza unazad počinje od redova m i m-1, nakon toga im se dodaje red m-2 i tako do samog kraja kada se u obzir uzima celokupan set podataka. EFA grafički prikaz pokazuje evoluciju svojstvenih vrednosti kako analizirana submatrica raste, evolutivni proces u matrici podataka od početka do kraja (forward EFA) ili orbnuto (backward EFA). Grafiči prikaz se bazira na prikazu logaritamske vrednosti (svojstvene vrednosti) u odnosu na broj reda koji je poslednji korišćen u PCA analizi ili bolje u odnosu na varijablu odgovornu za evolucioni proces koji se odnosi na dat red (vreme reakcije, retenciono vreme itd.) (slika 2.12.).



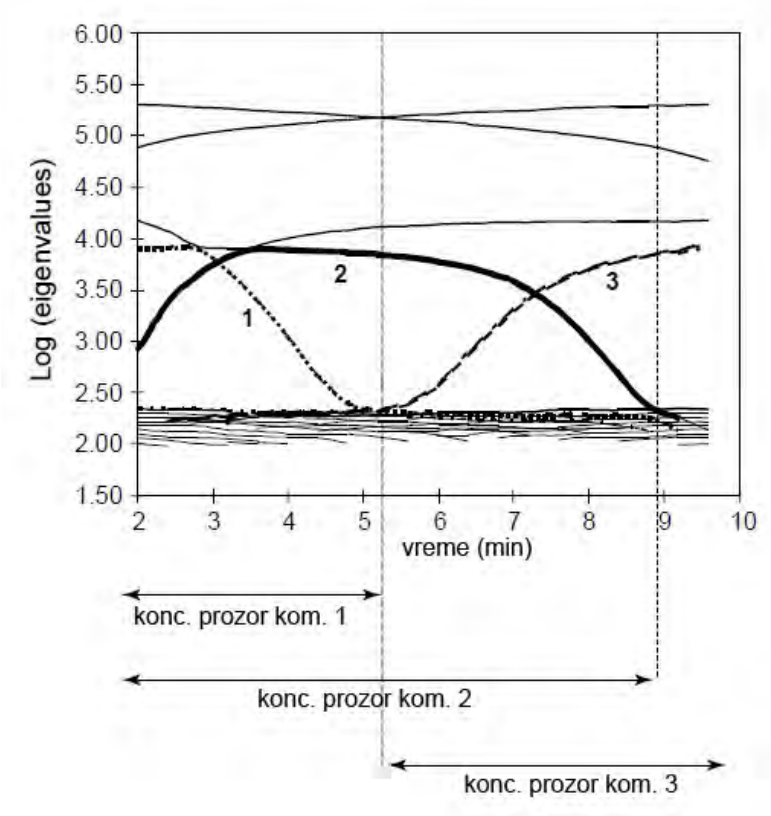
Slika 2.12. Konstruisanje EFA grafičkog prikaza. Kontinuirane linije povezuju svojstvene vrednosti (krugovi) dobijene u svakom koraku PCA forward EFA a prekinute linije povezuju

"eigenvalues" (kvadrati) dobijene u PCA backward EFA. Oznaka EV se odnosi na *eigenvalues* (svojstvene vrednosti).

EFA grafički prikaz pokazuje ukupni broj komponenti u setu podataka. Svojstvene vrednosti koji se odnose na pojedine komponente su jasno veće u odnosu na vrednosti koje možemo pripisati šumu. Na dnu grafika javlja se veliki broj preklapajućih krivih koje se mogu pripisati svojstvenim vrednostima šuma. Iznad definisanog nivoa sve vrednosti svojstvenih vrednosti su značajne. Ukupan broj pojedinačnih komponenti se može odrediti iz broja svojstvenih vrednosti dobijenih iz poslednjeg koraka PCA koji se izvodi u obe varijante EFA analize. Broj značajnih faktora koji sadrže informacije o spektralonoj promeni snimljenoj za vreme procesa jednak je broju nezavisnih reakcija +1 ili broju hemijskih vrsta koje doprinose analiziranim spektrima [Amrhein*et al.*, 1996].

Za razliku od PCA, EFA grafički prikaz pokazuje zone (vremenske intervale) gde se pojedine komponente pojavljuju ili nestaju. Pojava novih komponenti se detektuje u EFA analizi unapred preko pojave novih značajnih svojstvenih vrednosti. Obrnuta situacija je kod EFA analize unazad koji prati proces od kraja do početka. U ovom slučaju pojava novih značajnih svojstvenih vrednosti ukazuje da u odgovarajućem redu određena komponenta nestaje.

Kada se u toku procesa sukcesivno javljaju ili nestaju pojedine hemijske vrste najpogodniji za analizu je uporedni grafički prikaz EFA analize unapred i unazad. Tako za sistem sa n komponenti, profil prve komponente koja se pojavljuje je određen povezivanjem linije prve svojstvene vrednosti EFA analize unapred prikazan sa n-tom linijom značajne svojstvene vrednosti EFA analize unazad grafičkog prikaza (odnosi se na nestajanje prve komponente), itd. Zona matrice (redovi) gde koncentracioni profil jedne komponente pokazuje vrednosti različite od nule je vremenski interval pojave odgovarajuće komponente. Prikaz profila se često koristi kao početna tačka u iterativnim rezolucionim metodama (slika 2.13.).



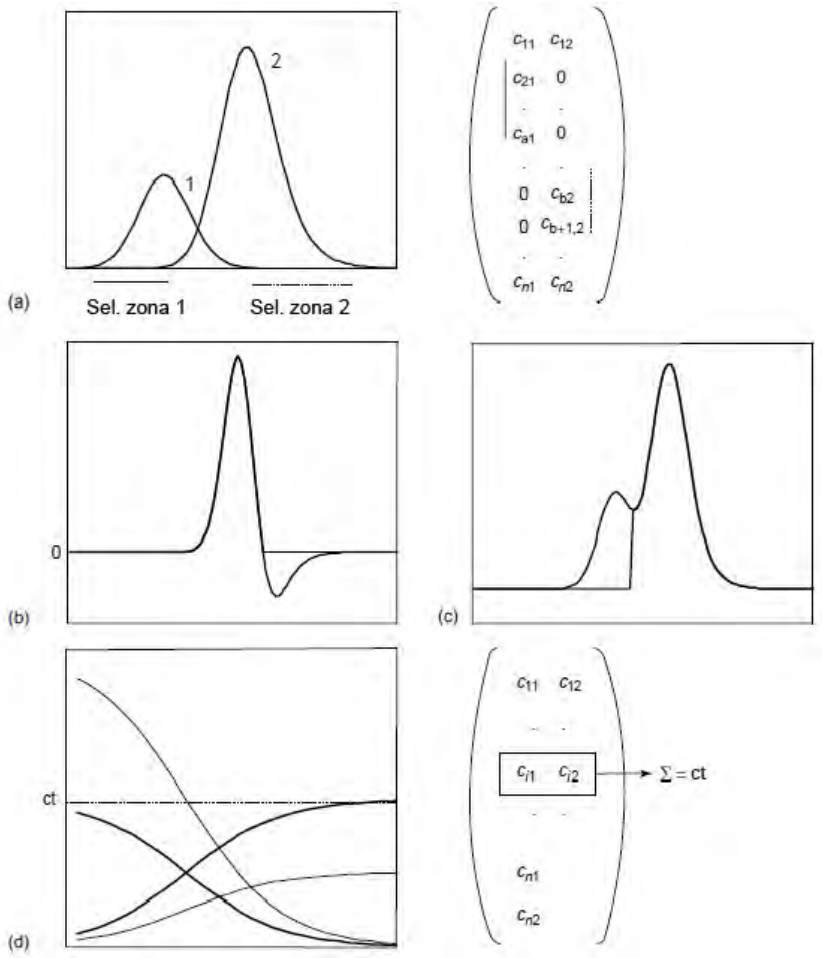
Slika 2.13. Prikaz koncentracionih profila dobijenih korišćenjem EFA, u odgovarajućim vremenskim intervalima.

Druga pogodna metoda za određivanje ukupnog broja komponenti u sistemu je "*Scree test", RPV*(*k*) [Meloun *et al.*, 2003; 2005]. *Scree test* se koristi za identifikaciju tačne dimenzionalnosti seta podataka i bazira se na pojavi da se rezidulane varijanse usrednjuju pre onih varijansi koje se odnose na slučajne greške koje su uključene u sam set podataka. Kada se rezidualni procenat varijance grafički prikaže u odnosu na broj k dimenzija korišćenih u obradi podataka, kriva RPV(k)=f(k) naglo pada i dobija konstantnu vrednost na nekoj tački. U odnosu na prvi kriterijum, tačka gde kriva počinje da se ravna ili gde se javlja diskontinuitet se uzima kao dimenzionalnost skupa podataka.

Iako razdvajanje ne zahteva prethodno poznavanje hemijskog sistema koji se proučava, dodatne informacije o komponentama, kada postoje, mogu se iskorisiti radi poboljšanja dobijenih rezultata i prilagođavanja dobijenih čistih profila u skladu sa poznatim karakteristikama. Ovo se postiže uvođenjem ograničenja. Ograničenja se mogu definisati kao bilo koja matematička ili hemijska karakteristika i se odnose se na sistem u celini ili neke njegove delove. Ograničenja se mogu prevesti u matematički jezik i navesti iterativni optimizacioni proces da modeluje profile u skladu sa zadatim uslovima.

Najčešća ograničenja povezana sa hemijskim karakteristikama profila su:

- Selektivnost (Selectivity). Najznačajnije ograničenje u rezolucionom procesu je selektivnost. Selektivne zone u matrici podataka su one oblasti gde je samo jedna čestica prisutna, tj. to su matrice sa rangom jedan, što je matematički opis ove karakteristike sistema. Prisustvo selektivnih zona za sve čestice u matrici podataka eliminiše rotacionu dvosmislenost i osigurava dobijanje pravih profila odziva hemijskog sistema. EFA je najpogodnija tehnika za detekciju i lociranje selektivnih zona u skupu sistema. Selektivnost za jedn hemijsku vrstu (komponentu) se može podesiti preko podešavanja odziva ostalih činioca sistema u selektivnoj zoni za dato jedinjenje na nulu.
- Ne-negativnost (Non-negativity). Ovo ograničenje određuje da vrednosti profila budu jednake ili veće od nule i primenjuje se na sve koncentracione profile i neke eksperimentalne odzive (responses), kao što je UV/Vis apsorbanca.
- Jednoznačnost (Unimodality). Ovo ograničenje određuje prisustvo samo jednog maksimuma po profilu. Primenjuje se kod hromatografskih pikova, koncentracionih profila nekih hemijskih reakcija i nekih oštrih pikova eksperimantalnog odziva kao što je kod voltamograma.
- Zatvorenost (Closure). Ovo ograničenje se primenjuje kod paralelnih ili konsekutivnih reakcija u sistemu za koje je suma koncentacija svih vrsta uključenih u reakcije ili suma nekih od njih određena da bude konstantna u svakoj fazi reakcije. Closure je prema tome ograničenje vezano za bilans masa.



Slika 2.14. Dejstvo ograničenja u MCR-ALS metodi. (a) Selektivnost. Puna i isprekidana linija pokazuju selektivne zone za jedinjenja 1 i 2. Desno je prikazana ograničavajuća matrica. (b) Ne-negativnost. (c) jednoznačnost i (d) zatvorenost: normalna i tanka linija prikazuju profil odgovora pre i posle primene ograničenja. Uz sliku (d) prikazana je ograničavajuću koncentraciona matrica.

MCR-ALS metoda rešava jednačinu 2.27.1. iterativno pomoću algoritma najznačajnijih najmanjih kvadrata (Alternating Least Squares) koji proračunava koncentracionu matricu $\boldsymbol{C}$ i matricu čistih spektara $\boldsymbol{S}^{\mathbf{T}}$ fitujući optimalno eksperimentalne podatke iz matrice podataka $\boldsymbol{D}$. Ova optimizacija se izvršava za broj komponenti koji je preliminarno procenjen bilo za $\boldsymbol{C}$ bilo za $\boldsymbol{S}^{\mathbf{T}}$. Polazne procene se mogu dobiti korišćenjem bilo EFA bilo Scree plot metoda. U ALS optimizaciji mogu se primeniti već navedena ograničenja. ALS iterativni proces se može prikazati preko sledećih jednačina:

$$\boldsymbol{S}^{\mathbf{T}}=\boldsymbol{C}^{+}\boldsymbol{D} \qquad (2.27.2.)$$

$$\boldsymbol{C}=\boldsymbol{D}(\boldsymbol{S}^{T})^{+} \qquad (2.27.3.)$$

gde su $\boldsymbol{C}^{+}(=\boldsymbol{C}^{T}\boldsymbol{C})^{-1}\boldsymbol{C}^{T}$ i $(\boldsymbol{S}^{T})^{+}$ $(=\boldsymbol{S}(\boldsymbol{S}^{T}\boldsymbol{S})^{-1})$ pseudo-inverzne matrice $\boldsymbol{C}$ i $\boldsymbol{S}^{T}$, a elementi u $\boldsymbol{S}^{T}$ i $\boldsymbol{C}$ moraju biti veći ili jednake nuli [Tauler, 1995; Navea *et al.*, 2001]. Spektralna matrica $\boldsymbol{S}^{T}$ i koncentraciona matrica $\boldsymbol{C}$ se mogu dobiti kontinualnom iteracijom dok se ne postigne konvergencija.

Konvergencija je postignuta kada u dva uzastopna iterativna ciklusa relativna razlika u standardnoj devijaciji ostataka između eksperimenta i podataka dobijenih ALS proračunom manja od predhodno definisane vredonsti (načešće 0,1%).

Brojne vrednosti koje pokazuju kvalitet optimizacione procedure su nedostatak slaganja (eng. Lack of fit, LOF), procenat objašnjene varijance i standardna devijacija ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke. LOF se definiše kao razlika između unešenih podataka i podataka dobijenih MCR-ALS procedurom [Fernández *et al.*, 2011; Jaumot *et al.*, 2005]. Ova vrednost se može izračunati preko jednačine:

$$Lack\ of\ fit\ \% = 100\sqrt{\frac{\sum_{i,j} e_{ij}^{2}}{\sum_{i,j} d_{ij}^{2}}} \qquad (2.27.4.)$$

gde se d_{ij} odnosi na elemente unešenih podataka matrice $\boldsymbol{D}$ dok se e_{ij} odnosi na ostatke dobijene iz razlike unešenih elemenata i podataka dobijenih MCR-ALS metodom.

Procenat objašnjene varijance i standardna devijacija ostataka se mogu izračunati preko jednačina:

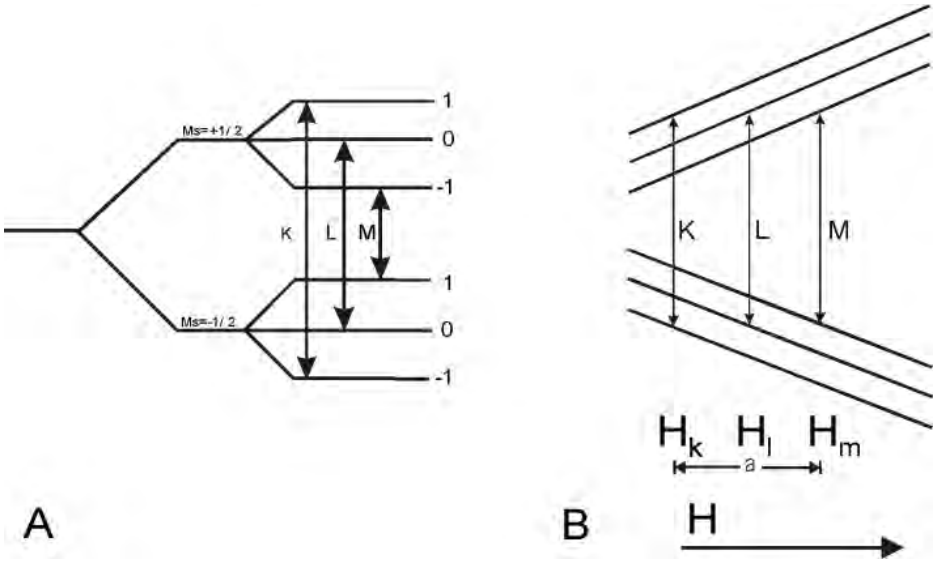
$$R^{2} = \frac{\sum_{i,j} d_{ij}^{2} - \sum_{i,j} e_{ij}^{2}}{\sum_{i,j} d_{ij}^{2}} \qquad (2.27.5.)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i,j} e_{ij}^{2}}{n_{redovi}\, n_{kolone}}} \qquad (2.27.6.)$$

gde su d_{ij} i e_{ij} su već definisani, dok se n_{redovi} i n_{kolone} odnose na broj redova i kolona u matrici $\boldsymbol{D}$.

2.4.2. Elektron spin rezonantna spektroskopija

Elektron spin rezonantna spektroskopija (ESR), poznata i kao elektron paramagnetna rezonanca (EPR), je spektroskopska metoda koja se zasniva na rezonantnoj apsorpciji elektromagnetnog zračenja od strane nesparenih elektrona u homogenom magnetnom polju. ESR spektroskopijom mogu se ispitivati samo paramagnetne supstance, odnosno supstance koje sadrže atome, jone ili molekule sa nesparenim elektronima [Rieger, 2007].



Slika 2.15. Elektronski spinski prelazi sa kuplovanjem

ESR spektar slobodnog radikala ili koordinacionog kompleksa sa jednim nesparenim elektronom je nejjednostavniji od svih spektara. Degeneracija spinskih stanja elektrona okarakterisanih kvantnim brojem m_s = -1/2; +1/2, uklanja se primenom spoljašnjeg magnetnog polja, a prelazi između dva različita spinska nivoa mogu se postići apsorpcijom zračenja odgovarajuće frekvence (slika 2.15.). Ako bi nespareni elektroni bili nezavisni od svog okruženja, tj. ako bi se ponašali kao slobodni elektroni, jedina informacija koju bi mogli da dobijemo iz ESR spektra bila bi integralna vrednost inteziteta, proporcionalna koncentraciji nesparenih elektrona. Međutim, nespareni elektron interaguje sa svojom okolinom i detalji ESR spektra zavise od prirode tih interakcija.

Postoje dva osnovna tipa interakcija koji su značajni za izgled ESR spektra slobodnih radikala.

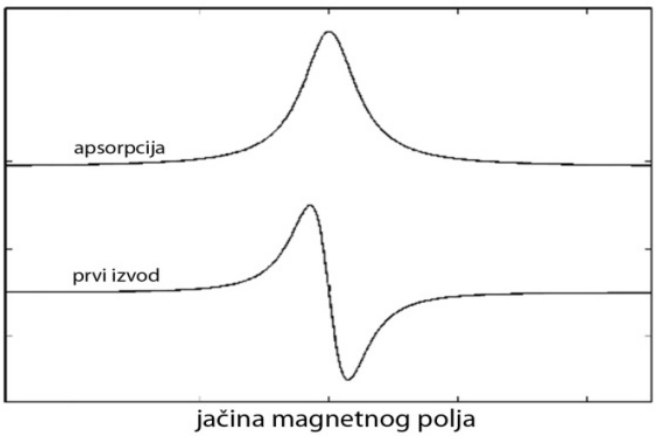
U zavisnosti da li ostatak molekula za koji je vezan atom na kome se nalazi nespareni elektron ima orbitalni magnetni moment, totalni magnetni moment je različit od spinskog

magnetnog momenta (može biti veći ili manji u zavisnosti od toga kako se kupluju vektori magnetnih momenata). Orbitalni i spinski uglovni moment se povezuju (kupluju) u efektivni spin što se u ESR spektru manifestuje promenom položaja linija u odnosu na slobodan elektron i izražava se preko *g* vredonsti.

Svako jezgro koje ima spin I cepa elektronske spinske nivoe na 2I+1 podnivoa. Pošto se dozvoljeni spinski prelazi dešavaju samo između podnivoa koji imaju istu vrednost m_I, cepanje energetskih nivoa pod dejstvom nuklearnog spina se ogleda kao cepanje rezonantne linije i to dovodi do pojave većeg broja linija u ESR spektru.

Ako se na nesparene elektrone u homogenom magnetnom polju, koji su podeljeni u dve grupe po energijama, deluje elektromagnetnim zračenjem čija je oscilujuća magnetna komponenta normalna na pravac magnetnog polja i čija frekvenca ν zadovoljava rezonantni uslov $h\nu = g\mu_B B$ javlja se mogućnost apsorpcije zračenja pri čemu dolazi do reorijentacije spina elektrona ($\beta \rightarrow \alpha$) i njegovog prelaska iz nižeg u viši enegretski nivo. Rezonantni uslov moguće je postići na dva načina jer su u jednačini samo dve eksperimentalno promenjljive veličine, frekvencija upadnog zračenja i jačina magnetnog polja. U praktičnom radu se ESR spektri skoro isključivo snimaju tako da se pri konstatnoj vrednosti ν upadnog zračenja menja jačina spoljasšnjeg magnetnog polja.

Sam prelaz koji se detektuje prilikom snimanja ESR spektra daje normalnu apsorpcionu krivu čija širina i oblik zavise od više faktora. Međutim, u praktičnom radu se zbog instrumentalnih razloga ESR spektri najčešće registruju u obliku prvog izvoda apsorpcionih krivih što im daje karakterističan izgled, a ujedno doprinosi boljoj rezoluciji u odnosu na klasične apsorpcione spektre (slika 2.16.).



Slika 2.16. Kriva apsorpcije i njen prvi izvod za sistem sa jednim nesparenim elektronom

Prisustvo nuklearnih hiperfinih interakcija u sistemima sa nesparenim elektronima dovodi do pojave većeg broja linija u odgovarajućim ESR spektrima što zavisi od jačine interakcija između nesparenog elektrona i okolinim jezgrima. Dva najčešća mehanizma preko kojih elektroni interaguju sa okolnim jezgrima su Fermijeva kontaktna interakcija i dipolarna interakcija. Treći mehanizam koji se naziva spinska polarizacija je od posebnog značaja za π elektrone organskih radikala.

Kod izotropnih sistema (npr. slobodni radikali koji se slobodno kreću u rastvoru) broj linija koje se u ESR spektru javljaju usled hiperfinog cepanja se može jednostavno izračunati. Za radikale koji imaju M ekvivalentnih jezgara sa spinom I, broj ESR linija biće $2MI + 1$. Za radikale koji sadrže M_1 ekvivalentnih jezgara sa spinom I_1 i grupu M_2 ekvivalentnih jezgara, svaki sa spinom I_2, broj očekivanih linija je $(2M_1I_1 + 1)\ (2M_2I_2 + 1)$.

ESR spektri sistema u kojima nespareni elektron stupa u interakciju sa n ekvivalentnih protona (ili nekih drugih atoma kod kojih je I=1/2) se sastoje iz n+1 linija čiji je odnos inteziteta proporcionalan koeficijentima binarnog izraza $(1+x)^n$.

U realnim sistemima elektroni nisu slobodni već su pridruženi jednom ili većem broju atoma što na različite načine može da utiče na izgled ESR spektara.

Nespareni elektron može da ima veću ili manju vrednost uglovnog momenta što ima za posledicu promenu *g* faktora. To je najizraženije kod sistema koje sadrže paramagnetne jone prelaznih metala.

Kao posledica hiperfine nuklearne interakcije u ESR spektrima se javlja veći broj linija čiji se broj i odnos intetiteta mogu odrediti na gore navedeni način. Kao jedan od karakterističnih parametara se iz takvih ESR spektara mogu odrediti konstante hiperfinog cepanja za pojedina atomska jezgra.

Interakcija nesparenog elektrona sa okolinom utiče i na oblik ESR spektralnih linija. Oblik linija može dati informacije o npr. brzini kretanja čestica sa nesparenim elektronom. Kod slobodnih radikala u tečnom stanju se uobičajno javlja Lorencov oblik linija u ESR spektru, a kod slobodnih radikala u čvrstom stanju tipično se javlja Gausov oblik.

Interakcije čestica koje poseduju nespareni elektron sa okolinom, u čvrstom stanju, imaju anizotropni karakter i ESR spektri takvih sistema imaju karakterističan izgled pri čemu se mogu javiti dve različite *g* vrednosti (za sisteme sa aksijalnom simetrijom) ili tri različite *g*

vrednosti (za sisteme koji ne poseduju aksijalnu simetriju). Ukoliko u tim sistemima postoji nuklearna hiperfina interakcija takođe se mogu javiti dve odnosno tri različite vrednosti za konstante hiperfinog cepanja.

Iz ESR spektara se mogu odrediti *g* vrednosti i konstante hiperfinog cepanja što zajedno sa podacima o broju i intezitetu linija može da posluži za određivanje strukture čestica koje poseduju nespareni elektron [Rieger, 2007]. Kako je proces autooksidacije polifenolnih jedinjenja slobodno-radikalska reakcija metoda ESR je veoma pogodna za praćenje ovog procesa i određivanje struktura prelaznih slobodno-radikalskih vrsta [Yoshioka *et al.*, 2003].

2.4.3. Tečna hromatografija visokih performansi

Tečna hromatografija visokih performansi (tečna hromatografija pri visokim pritiscima) ili HPLC (eng. High Performance Liquid Chromatography ili High Pressure Liquid Chromatography) je hromatografska tehnika koja se primenjuje radi razdvajanja individualnih komponenti iz složenih sistema u cilju njihove identifikacije, kvantifikacije ili izdvajanja čistih komponenti.

Hromatografija se može opisati kao proces transfera mase koji uključuje više fenomena kao što su adsorpcija, ekstrakcija itd. Kod HPLC-a se tečna mobilna faza zajedno sa uzorkom uvodi u kolonu napunjenu sorbentom (stacionarna faza). Komponente iz smeše se razdvajaju na osnovu različitog stepena interakcije sa česticama stacionarne faze. Mobilna faza može biti stalnog (izokratsko eluiranje) ili promenljivog (eluiranje sa gradijentom) sastava. Njen sastav i temperatura imaju važnu ulogu u procesu razdvajanja. Osim toga vrlo značajan faktor je i priroda stacionarne faze pri čemu važi opšte pravilo da se dobro razdvajanje polarnih supstanci postiže na polarnim stacionarnim fazama a nepolarnih na nepolarnim. Visok pritisak koji se koristi za iniciranje protoka mobilne faze kroz kolonu takođe doprinosi efikasnosti razdvajanja. Pogodan izbor navedenih parametara omogućava da se HPLC tehnikom razdvoje pojedinačne komponente veoma složenih smeša [Corradini*et al.*, 1998].

Za detekciju razdvojenih komponenti mogu se koristiti različite vrste detektora, a naročito su pogodni oni koji mogu da izvrše i dodatnu karakterizaciju razdvojenih komponenti. Kod savremenih HPLC uređaja najčešće se koriste detektori koji mogu da snimaju UV/Vis spektre (Diode Array Detector-DAD), fluorescentne spektre (FL detektori) ili masene spektre (MS detektori) pojedinačnih komponenti.

Značajan parametar koji se može dobiti HPLC analizom je retenciono vreme za pojedine komponente uzorka što se može primeniti za kvalitativnu analizu ukoliko postoje standardi ispitivanih supstanci [Kazakevich & Lobrutto, 2007].

Primena HPLC tehnike u kombinaciji sa DAD i FL detekcijom se pokazala kao vrlo efikasna za analizu različitih sistema i smeša polifenolnih jedinjenja [Merken & Beecher, 2000].

2.4.4. Elektron-sprej jonizaciona masena spektrometrija (ESI-MS)

ESI-MS je metoda masene spektrometrija koja je veoma pogodna i često se koristi za detekciju kod HPLCa. Osnovni princip ESI-MS je stvaranje finog aerosola ispitivanog rastvora koga čine visoko naelektrisane kapljice u jakom električnom polju. Ispitivani rastvor prolazi malim protokom kroz kapilarnu cev (najčešće 1-10, max. 200 μL min^{-1}) u jakom električnom polju pod atmosferskim pritiskom. Interval potencijala između kapilare i spregnute elektrode je od 3 do 6 kV. Navedeno polje stvara akumulaciju naelektrisanja na površini tečnosti koja izlazi iz kapilare, što dovodi do formiranja visko naelektrisanih kapljica. Ograničavanje disperzije nastalog spreja unutar granica definisanog prostora postiže se koaksijalnom injekcijom inertong gasa, najčešće azota. Uklanjanje molekula rastvarača postiže se daljim prolaskom formiranih kapljica kroz zonu zagrejanog inertnog gasa ili kroz zagrejanu kapilaru. Rastvarač koji se nalazi u kapljicama brzo isparava, što dalje dovodi do samanjenja zapremine i povećanja naelektrisanja po jedinici zapremine. Ove naelektrisane kapi nastavljaju dalje da gube molekule rastvarača i kad elektično polje na njihovoj površini postane dovoljno jako, desorpcijom sa površine nastaju slobodni (desolvatisani) joni [Lee, 2012].

Kod ESI-MS analize pozitivni joni (positive mode, ESI+) nastaju vezivanjem protona sa supstrata na ispitivani molekul:

$$[B] + [SH] \rightarrow [BH]^+ + [S]^- \qquad (2.28.1.)$$

Obrnutim procesom (otpuštanem protona) nastaje negativan jon koji ima ulogu kiseline (negative mode, ESI-):

$$[AH] + [S] \rightarrow [A]^- + [SH]^+ \qquad (2.28.2.)$$

Joni makromolekula mogu da sadrže višestruko naelektrisanje, istog ili suprotnog znaka, što je posledica prisustva više jonizujućih mesta. Manji organski molekuli obično daju jednostruko naelektrisane jone, mada u nekim slučajevima mogu da se formiraju dvostruko ili

trostruko naelektrisani joni, ako molekul ima mogućnosti za to. ESI-MS se može primeniti i kod molekula koji nemaju jonizujuća mesta formiranjem adukta sa jonima Na^+, K^+, NH_4^+, Cl^- i sl.

ESI-MS se može primenjivati i za direktno snimanje masenih spektara iz tečnog uzorka. ESI-MS koristi relativno blage uslove jonizacije, što ostavlja prisutne molekulske i jonske vrste mahom u nepromenjenim obliku. Struktura molekula se može razmatrati na osnovu m/z odnosa karakterističnih pikova u MS spektru. ESI-MS ima nisku granicu detekcije (10^{-6} moldm $^{-3}$) što omogućava da se analize vrše sa malom količinom uzorka.

ESI-MS analiza se može uspešno primeniti i na analizu smeše polifenenola iz prirodnih proizvoda [Sanz *et al.*, 2012] ili proizvoda oksidacije polifenolnih jedinjenja [Antolovich *et al.*, 2004; Choueiri *et al.*, 2012].

3. Eksperimentalni deo

Procesi autooksidacije vicinalnih trihidroksilnih polifenola pirogalola, galne kiseline i etil-galata u vodenim rastvorima bez prisustva metalnih jona pri različitim pH vrednostima vodenih rastvora i uticaj dvovalentnih dijamagnetnih metalnih jona (Mg(II), Ca(II), Sr(II), Ba(II), Zn(II), Cd(II) i Pb(II)) na procese autooksidacije navedenih polifenola proučavani su u odgovarajućim model sistemima. Karakterizacija procesa autooksidacije polifenolinih jedinjenja pod različitim uslovima vršena je primenom UV/Vis, ESR, HPLC-DAD, HPLC-FL, ESI-MS tehnikam uz primenu hemometrijskih metoda za obradu spektralnih podataka (grafička matrična analiza i MCR-ALS) i kompjuterske simulacije ESR spektara (slika 3.1).

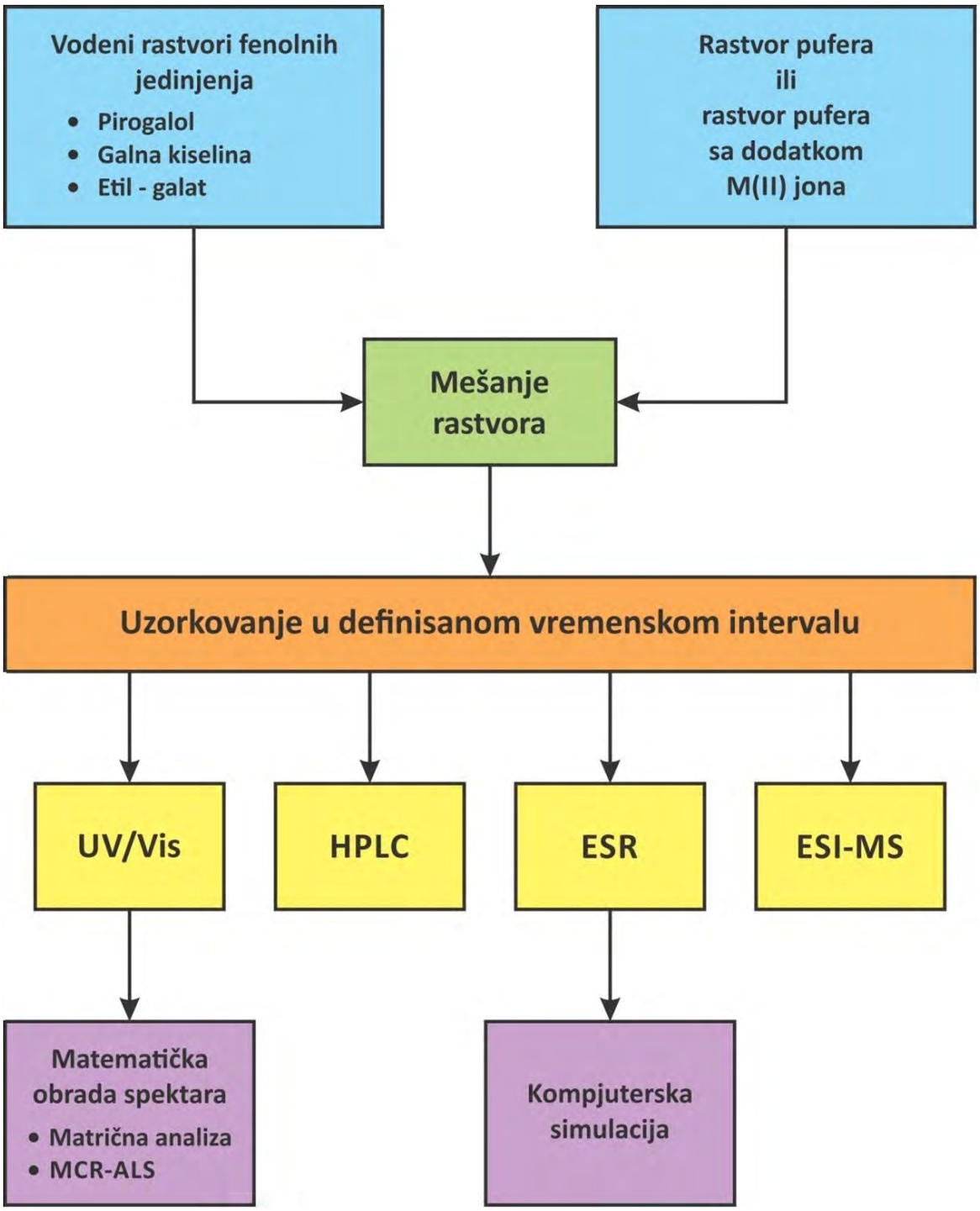
3.1. Supstance korišćene za eksperimentalni rad

Sve korišćene supstance su bile analitičke čistoće (p.a). Pirogalol (Fluka, Nemačka), galna kiselina (Sigma, Nemačka) i etil-galat (Sigma, Nemačka) su korišćeni bez prečišćavanja jer je njihova čistoća potvrđena korišćenjem HPLC analize. Za pripremu svih rastvora korišćena je dejonizovana voda zasićena vazduhom. Soli metala $MgCl_2$, $CaCl_2$, $SrCl_2 \times 6H_2O$, $BaCl_2$, $Zn(CH_3COO)_2$, $Cd(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$, $Pb(CH_3COO)_2 \times 3H_2O$ proizvođača Sigma, Nemačka su korišćene bez dodatnog prečišćavanja. Za održavanje konstantne pH vrednosti u model sistemima korišćeni su acetatni pufer (pH 5,5; 6,0; 6,5), Tris pufer (pH 7,4; 8,0) i karbonatni pufer (pH 9,0; 9,5; 10,0; 10,5).

3.2. Modelovanje sistema za UV/Vis spektrofotometriju

Osnovni rastvori pirogalola, galne kiseline i etil-galata koncentracije 0.6 mmol dm^{-3} priremani su pre svakog eksperimenta rastvaranjem odgovarajuće mase supstance u vodi. Puferski rastvori korišćeni za održavanje konstantne pH vrednost u toku procesa autooksidacije su bili: acetatni pufer (0,2 mol dm^{-3}, pH 5,5; 6,0; 6.5), Tris pufer (0,2 mol dm^{-3}, pH 7,4; 8,0; 8,5) i karbonatni pufer (0,2 mol dm^{-3}, pH 9,0; 9,5; 10,0; 10,5) i pripremani su rastvaranjem odgovarajućih supstanci u vodi. Potrebna masa supstanci je određena korišćenjemo online kalkulatora: http://www.biomol.net/en/tools/buffercalculator.htm. pH vrednost pufera je precizno podešavana titracijom pomoću rastvora NaOH ili HCl koncentracija 0,1, odnosno 0,01 mol dm^{-3}. Za ispitivanje uticaja dvovalentnih dijamagnetnih metalnih jona na procese autooksidacije ispitivanih jedinjenja pripremani su rastvori odgovarajućih pufera (acetatni pufer (0,2 mol dm^{-3}, pH 5,5; 6,0; 6.5), Tris pufer (0,2 mol dm^{-3}, pH 7,4; 8,0; 8,5) i karbonatni pufer (0,2 mol dm^{-3}, pH 9,0; 9,5; 10,0; 10,5)) koji su sadržali $MgCl_2$, $CaCl_2$, $SrCl_2$, $BaCl_2$, $Zn(CH_3COO)_2$, $Cd(CH_3COO)_2$, $Pb(CH_3COO)_2$ u

koncentraciji od 0,2 mol dm^{-3}. Navedena koncentracija je postignuta rastvaranjem tačno odmerene mase navedene soli u pripremljeni rastvor pufera. Nakon rastvaranja je po potrebi ponovo podešavana pH vrednost za svaki od rastvora. Autooksidacija pirogalola, galne kiseline i etil-galata je inicirana mešanjem jednakih zapremina osnovnog rastvora fenolog jedinjenja i odgovarajućeg pufera sa ili bez metalog jona.



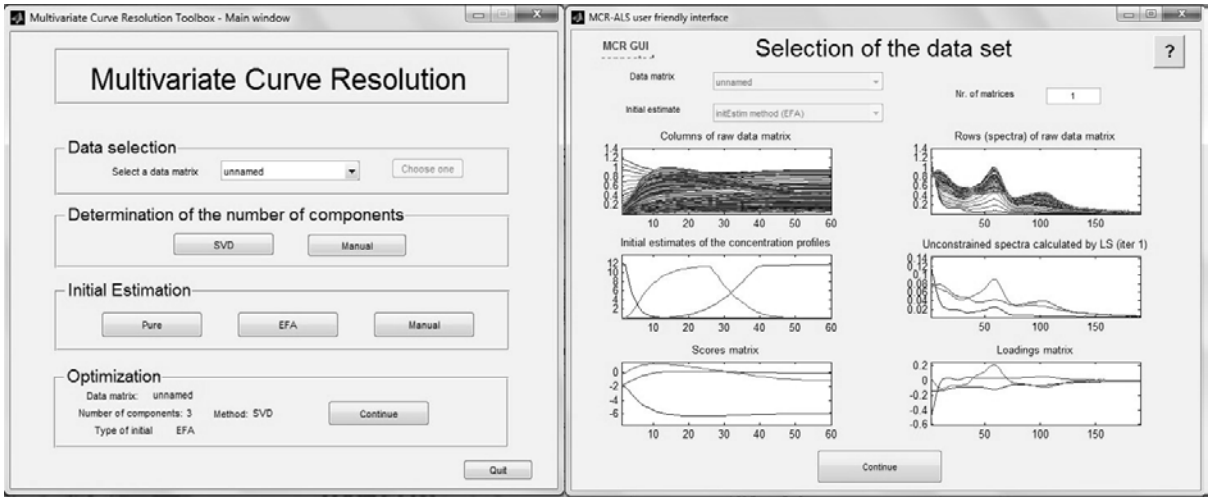
Slika 3.1. Šematski prikaz eksperimentalnog rada

Za snimanje UV/Vis spektara je korišćen Evolution 60 UV/Vis spektrofotometar (Thermo Scientific, USA) sa kvarcnom ćelijom (kivetom) debljine 1,0 cm. Prvi spektar za sve ispitivane sisteme sniman je odmah nakon mešanja vodenog rastvora ispitivanog jedinjenja i pufera (t=0). Vremenski intervali između snimanja UV/Vis spektara u toku procesa autooksidacije su iznosli: pirogalol bez metalnih jona na pH vrednosti 7,4 - 5 minuta, pirogalol bez metalnih jona na pH vrednosti 8,0 – 1 minut, pirogalol u prisustvu metalnih jona (Mg(II), Ca(II), Sr (II), Ba(II) i) na pH vrednosti 7,4 - 1 minut, u prisustvu Zn(II) jona na pH vrednosti 5,5 i 6,5 – 5 minuta, a u prisustvu Cd(II) i Pb(II) na pH vrednosti 5.5 - 5 h, galna kiselina bez metalnih jona na svim vrednostima pH - 1 minut, galna kiselina u prisustvu metalnih jona (Mg(II), Ca(II), Sr (II), Ba(II)) na pH vrednosti 7,4 - 5 minuta, a u prisustvu Zn(II), Cd(II) i Pb(II) na pH vrednosti 5,5 - 5 h, etil-galat bez metalnih jona na svim vrednostima pH - 1 minut, etil-galat u prisustvu metalnih jona na pH vrednosti 7,4 - 1 minut (Mg(II), Ca(II), Sr (II), Ba(II)), a u prisustvu Zn(II), Cd(II) i Pb(II) na pH vrednosti 5,5 - 5 h.

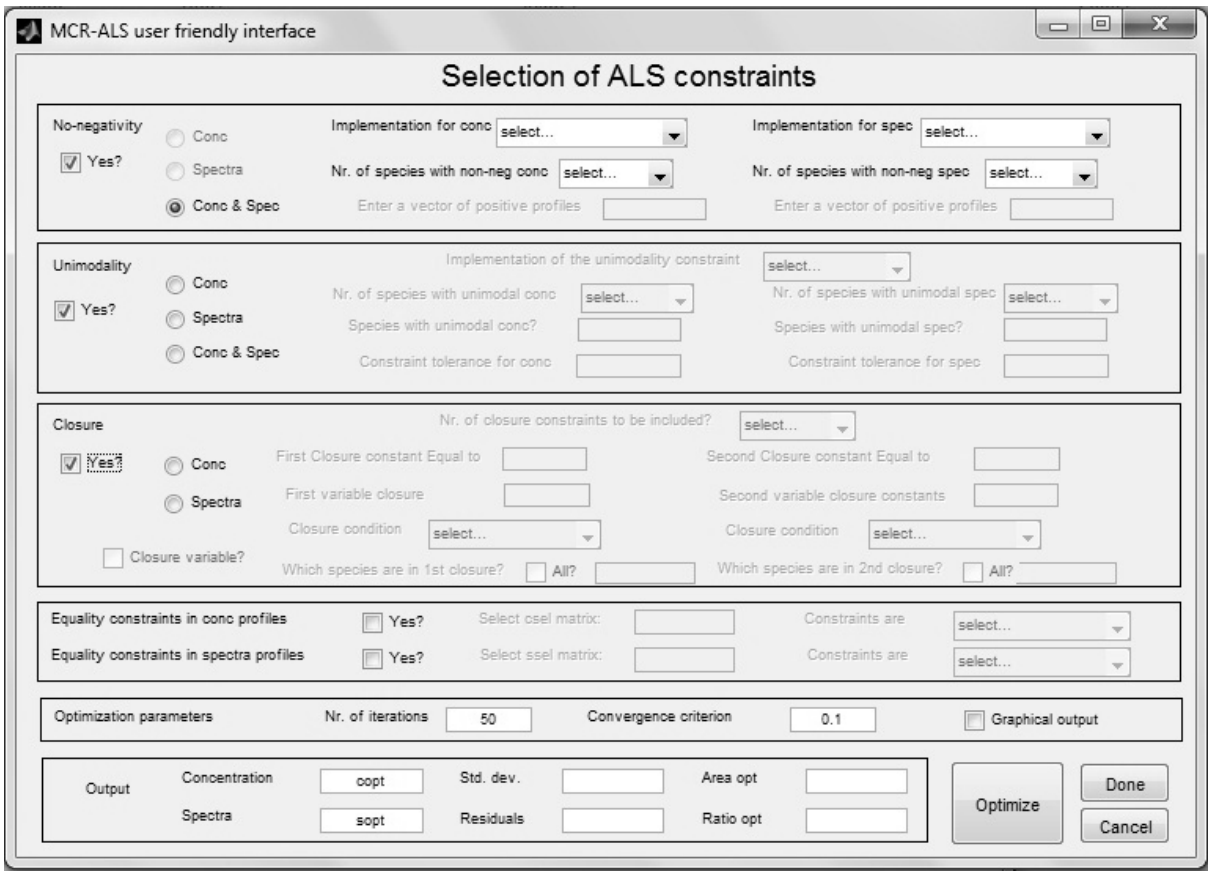
3.3. Hemometrijska i statistička obrada podataka dobijenih UV/Vis spektrofotometrijom

Sve podaci dobijeni UV/Vis spektrofotometrijskim merenjima naknadno su obrađivani primenom dve hemometrijske metode. Grafička matrična analiza UV/Vis spektara za pojedine ispitivane sisteme vršena je korišćenjem Excel tabele u kojoj su primenjene jednačine navedene u poglavlju 2.4.1.1. Svi ostali kompjuterski proračuni i hemometrijska obrada podataka dobijenih UV/Vis spektralnom analizom vršeni su korišćenjem MATLAB programa (Mathwork Inc., version 7.12) uz primenu MCR-ALS metode. Kod primene MCR-ALS metode za hemometrijsku obradu podataka korišćen je *user-friendly* korisnički interfejs [Jaumot *et al.*, 2005] (slike 3.2. i 3.3). Vrednost za LOF (jednačina 2.27.4.) je podešena na manje od 1%.

Svi statistički proračuni vezani za *scree plot* su urađeni korišćenjem programa Statistica 8.0 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, USA).



Slika 3.2. Prikaz prozora korisničkog interfejsa: za izbor polaznih faktora za MCR analizu (levo), preliminarni rezultati pre ALS optimizacije (desno).



Slika 3.3. Prikaz prozora korisničkog interfejsa za izbor ALS ograničenja.

3.4. Modelovanje sistema za ESR spektroskopiju

Priprema rastvora za snimanje ESR spektara bila je identična kao i kod pripreme rastvora za UV/Vis spektrofotometrijsku karakterizaciju ispitivanih sistema (Poglavlje 3.2.).

ESR spektri snimani su na X-band Bruker ESR-300E spektrometru (Bruker, Germany) korišćenjem tankoslojne kvarcne ćelije ER-160FC. Parametri za snimanje spektara su bili sledeći: mikrotalasna frekvencija 9,64 GHz, mikrotalasna snaga 2,0 mW, centar polja 344,0 mT (3440 G), širina polja 2,0 mT (20 G), modulaciona frekvencija 100 kHz, modulaciona amplituda 0,01 mT (0,1 G), vremenska konstanta 10,24 ms, vreme konverzije 327,68 ms. ESR spektralni parametri detektovanih slobodnoradikalskih vrsta dobijeni su kompjuterskom simulacijon ESR spektara korićenjem SimFonia programa (verzija 1.25, Bruker, Germany) i EPR-WinSIM:NIEHS programa (verzija 0.98, Public EPR Software Tool, USA).

3.5. Modelovanje sistema za HPLC-DAD i HPLC-FL analizu

Priprema rasvora za HPLC-DAD i HPLC-FL analizu bila je identična kao i priprema rastvora za UV/Vis spektrofotometrijsku karakterizaciju ispitivanih sistema (Poglavlje 3.2.).

Za HPLC analizu korišćen je Agilent Technologies 1200 series sistem sa autosemplerom i DAD i FL detektorima. Za razdvajanje komponenti korišćena je C-18 kolona, Zorbax SB-18 (4,6×150 mm, veličina čestica 3,5 μm). Eluiranje je vršeno izokratski mobilnom fazom metanol/voda/ortofosforna kiselina u odnosu 20 : 79,9 : 0.1. Protok mobilne faze iznosio je 1,0 mL min^{-1}. Temperatura kolone iznosila je 30 ^{o}C, a zapremina injektovanog uzorka 5 μL.

Pri korišćenju DAD detektora detekcija razdvojenih komponenti vršena je na talasnoj dužini od 350 nm. Pri korišćenju fluorescentnog detektora talasna dužina ekscitacije iznosila je 250, a emisije 450 nm.

3.6. Modelovanje sistema za ESI-MS analizu

ESI-MS analiza korišćena je samo za ispitivanje uticaja pH vrednosti vodenog rastvora na procese autooksidacije. Priprema rastvora ispitivanih jedinjenja za ESI-MS analizu bila je analogna pripremi rastvora za UV/Vis spektrofotometrijsku analizu (Poglavlje 3.2.). Za puferovanje rastvora korišćen je amonijum acetat koncentracije 0,2 mol/dm^3, a precizno podešavanje pH vrednosti na 7,0 i 8,5 vršeno je titracijom pomoću rastvora sirćetne kiseline ili amonijaka.

Za ESI-MS analizu korišćen je Shimadzu Liquid Chromatograph Mass Spectrometer LCMS 8030 sa kvadropolnim detektorom. Primenjivana je tehnika direktnog injektovanja (DIMS) tako što je uzorak injektovan u LC-MS mobilnu fazu (50% vodeni rastvor metanola) sa protokom od 200 μl min^{-1} direktno u ESI izvor. ESI-MS spektri su snimani u opsegu m/z vrednosti od 100 do 500 i analizirani su spektri dobijeni u negativnom modu. Pre analize svakog pojedinačnog uzorka sistem je tri puta ispiran čistom mobilnom fazom da bi se osiguralo da nema prenosa predhodnog uzorka u sledeći. Pri snimanju ESI-MS spektara su korišćeni su sledeći parametri: temperatura grejnog bloka – 500 ^{o}C, protok azota za sušenje – 15 l min^{-1}, protok azota za raspršivanje 3 l/min, napon na kapilari – 4,5 kV, temperatura desolvatacije – 230°C.

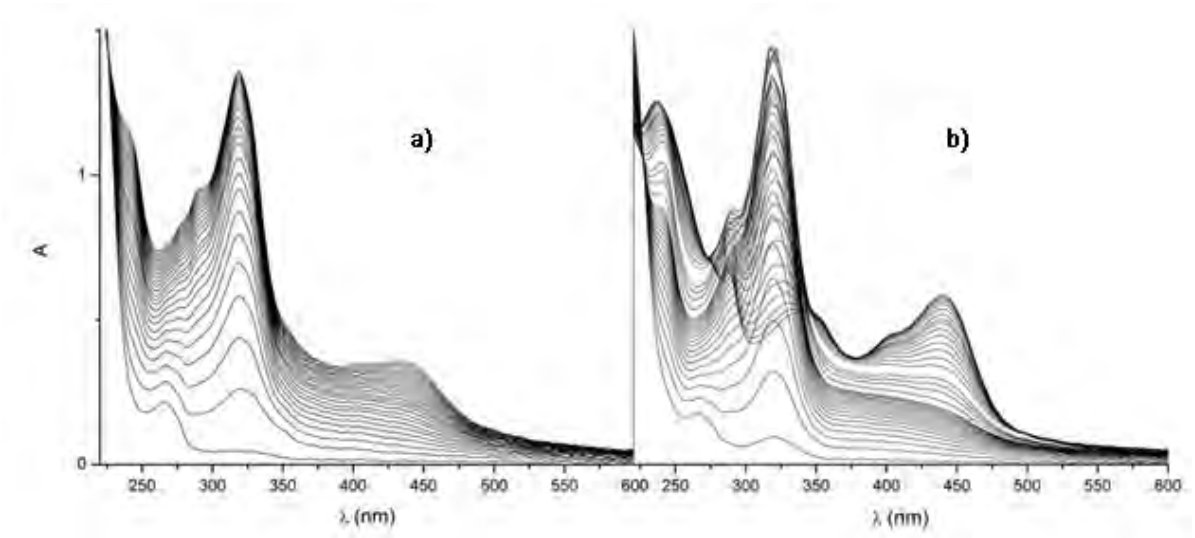
4. Rezultati i diskusija

4.1. Pirogalol

4.1.1. Autooksidacija pirogalola u slabo baznim vodenim rastvorima

4.1.1.1. UV/Vis spektralna analiza

Na slici 4.1. prikazani su UV/Vis spektri snimljeni u toku autooksidacije pirogalola (PG) na pH 7,4 (rastvor A) i na pH 8,0 (rastvor B). Različiti spektralni profili koji se mogu uočiti u ova dva slučaja potvrđuju da mehanizam autooksidacije pirogalola zavisi od pH sredine. Takođe, proces na pH 8,0 je kompleksniji u odnosu na proces na pH 7,4 sa mogućim formiranjem više autooksidacionih proizvoda.

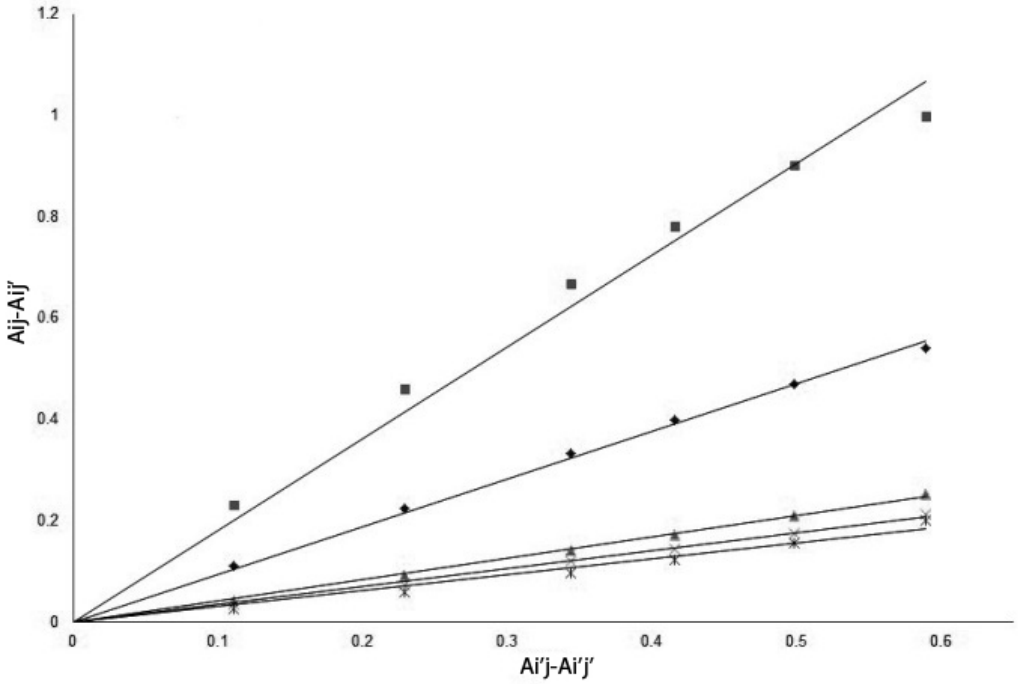


Slika 4.1. UV/Vis spektri snimljeni u toku procesa autooksidacije pirogalola u slabo baznim vodenim rastvorima: a) C(PG) = 300 μmol dm^{-3}, vremenski interval snimanja na 5 minuta, pH 7,4; b) C(PG) = 300 μmol dm^{-3}, vremenski interval snimanja na 1 minut, pH 8,0.

Vizuelno poređenje dobijenih spektara pokazuje pojavu apsorpcionog maksimuma na oko 320 nm kod oba procesa. Spektri sa slike 4.1. za rastvor a) pokazuju pojavu više maksimuma. Tri se javljaju u UV delu spektra oko 235, 285 i 320 nm, a jedan u oblasti oko 440 nm. Za vreme trajanja procesa apsorbancija se konstantno povećava u svim delovima spektra. Nakon 120 minuta nije bilo značajnih promena između uzastopno snimanih UV/Vis spektara u razmaku od 5 minuta. Proces na pH 8,0 u početnoj fazi ima slične karakteristike kao proces na pH 7,4 ukazujući na isti mehanizam reakcije jer snimljeni spektri imaju sličan izgled kao spektri snimljeni u toku autookisdacije na pH 7,4. Nakon 20 minuta dolazi do značajnih promena u spektralnim karakteristikama ispitivanog sistema što ukazuje na promenu

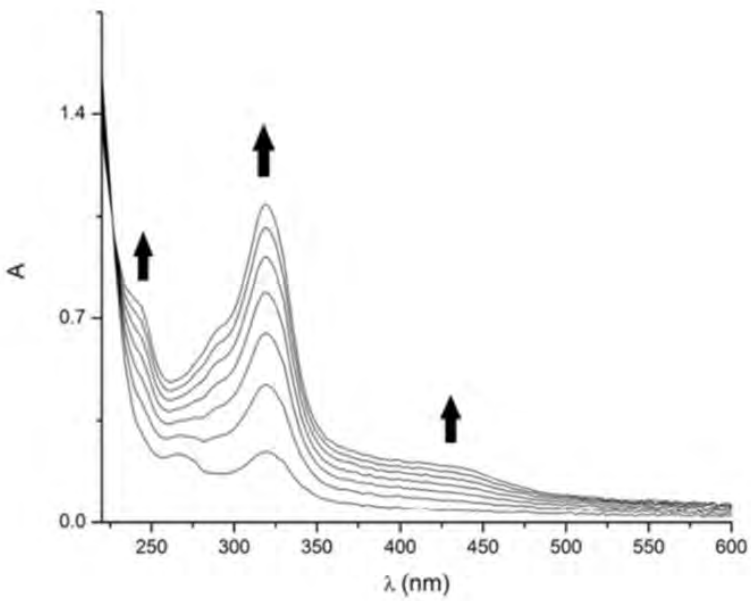
mehanizma autooksidacije. Apsorpcioni maksimum na oko 320 nm počinje da opada, dok maksimumi na oko 235 i 285 nastavljaju da rastu, a uz to se pojavljuje novi pregib na oko 360 nm. Apsorpcioni maksimum u vidljivom delu spektra nastavlja da raste. Nakon 40 minuta apsorpcioni maksimum na oko 285 nm počinje da opada uz dalje opadanje maksimuma na oko 320 nm koji u daljem toku reakcije potpuno nestaje. Pregib na oko 360 nm pri kraju reakcije postaje jasno definisani maksimum. Apsorpcioni maksimum u vidljivom delu spektra konstanto raste u celokupnom vremenskom intervalu snimanja spektara. Uočava se i pojava izobestičke tačke na 270 nm, a nakon 70 minuta trajanja reakcije spektralne promene između uzastopno snimljenih spektara postaju zanemarljive.

Slika 4.2. prikazuje grafičku analizu spektara sa slike 4.1. za proces autooksidacije na pH 7,4 uz primenu testa za dve apsorbujuće čestice. Dobijeni rezultati pokazuju dobru linearnost sa zadovoljavajućim korelacionim koeficijentima, što pokazuje da su za sve vreme autooksidacije pirogalola na pH 7,4 prisutne dve apsorbujuće čestice.

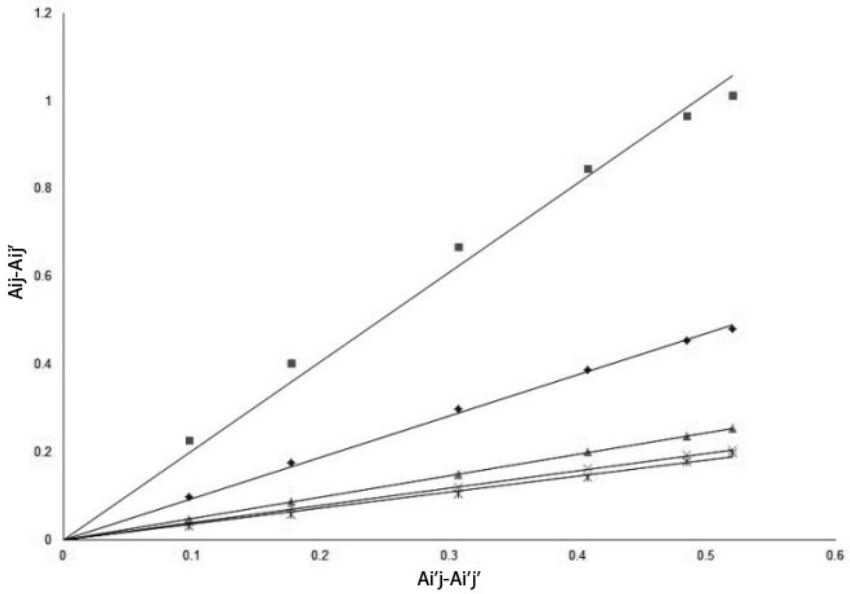


Slika 4.2. Grafička analiza preko matrične metode spektara sa slike 4.1. Primenjen je test za dve apsorbujuće čestice, i' = 240 nm i j' = prvi spektar (♦ = 280 nm, ■ = 320 nm, ▲ = 360 nm, × = 400 nm, * = 440 nm).

Na slici 4.3. su prikazani spektri snimljeni u toku procesa autooksidacije pirogalola na pH 8,0 do 12 minuta.



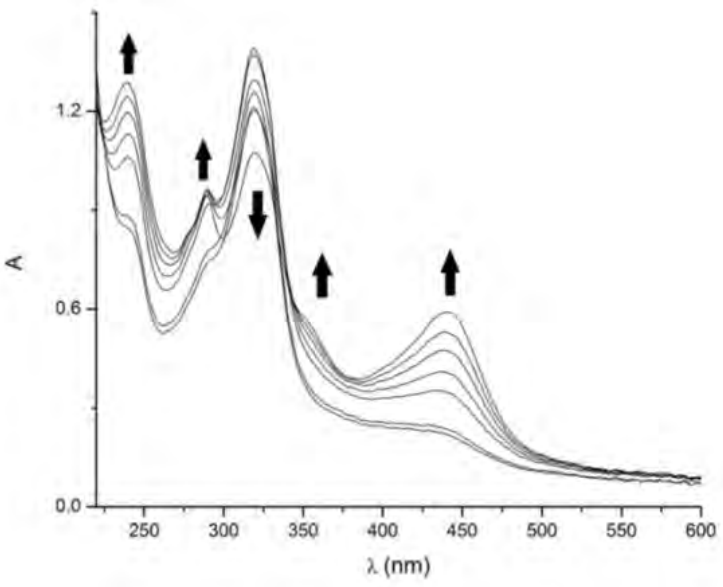
Slika 4.3. UV/Vis spektri snimljeni u toku procesa autooksidacije pirogalola na pH 8,0 do 12 minuta (prvi snimak je sam početak reakcije, a poslednji na 12 minuta od početka reakcije, spektri su snimani u intervalu od 2 minuta).



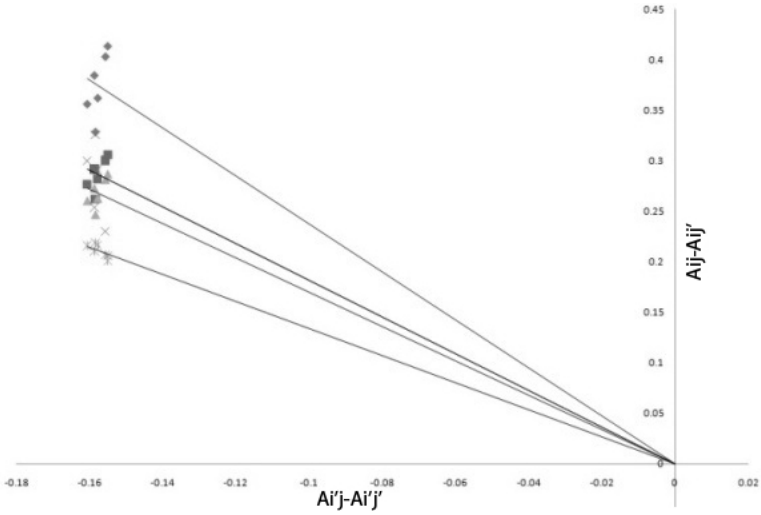
Slika 4.4. Grafička analiza prikazanih spektara na slici 4.3. preko matrične metode. Primenjen je test za dve apsorbujuće čestice, i' = 240 nm i j' = prvi spektar (♦ = 280 nm, ■ = 320 nm, ▲ = 360 nm, × = 400 nm, * = 440 nm).

Rezultati grafičke analize pokazuju da su do 12 minuta i u ovom sistemu prisutne dve apsorbujuće čestice kao i kod procesa na pH 7,4.

Vizuelno poređenje spektara prikazanih na slici 4.5. pokazuje da nakon 14 minuta reakcija autooksidacije počinje da se ponaša po drugačijem mehanizmu. Grafička analiza pokazuje da u sistemu ima više od dve čestice, jer test za dve čestice ne daje zadovoljavajući rezultat (slika 4.6.).

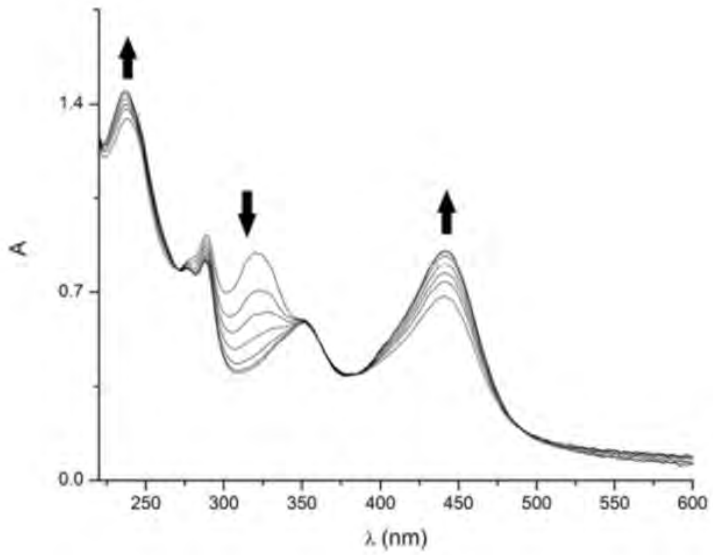


Slika 4.5. UV/Vis spektri snimljeni u toku procesa autooksidacije pirogalola na pH 8,0 do 28 minuta (prvi snimak je na 14 minuta, poslednji na 26 minuta od početka reakcije, spektri su snimani u intervalu od 2 minuta).

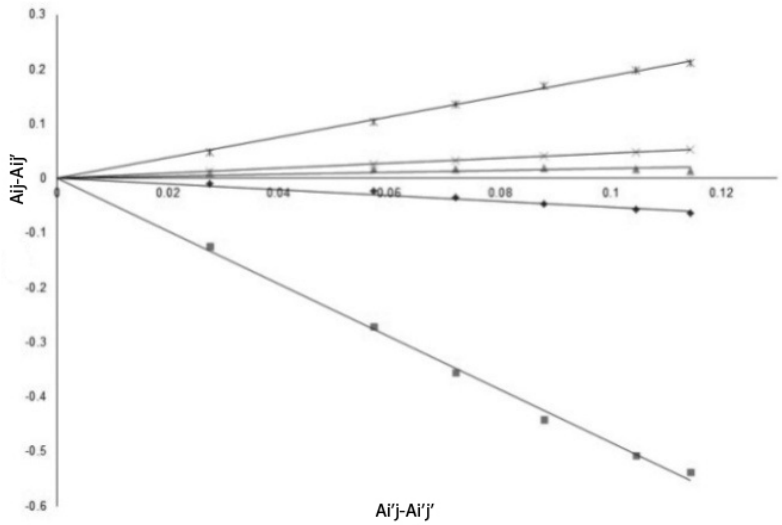


Slika 4.6. Grafička analiza prikazanih spektara na slici 4.5. preko matrične metode. Primenjen je test za dve apsorbujuće čestice, i' = 240 nm i j' = prvi spektar (♦ = 280 nm, ■ = 320 nm, ▲ = 360 nm, × = 400 nm, * = 440 nm).

UV/Vis spektri snimljeni nakon 30 minuta odvijanja reakcije i njihova analiza matričnom metodom pokazuje da se u ovom sistemu ponovo uspostavlja ravnoteža između dve apsorbujuće čestice (slike 4.7. i 4.8.).



Slika 4.7. UV/Vis spektri snimljeni u toku procesa autooksidacije pirogalola na pH 8,0 do 44 minuta (prvi snimak je na 30 minuta, poslednji na 42 minuta od početka reakcije, spektri su snimani u intervalu od 2 minuta).



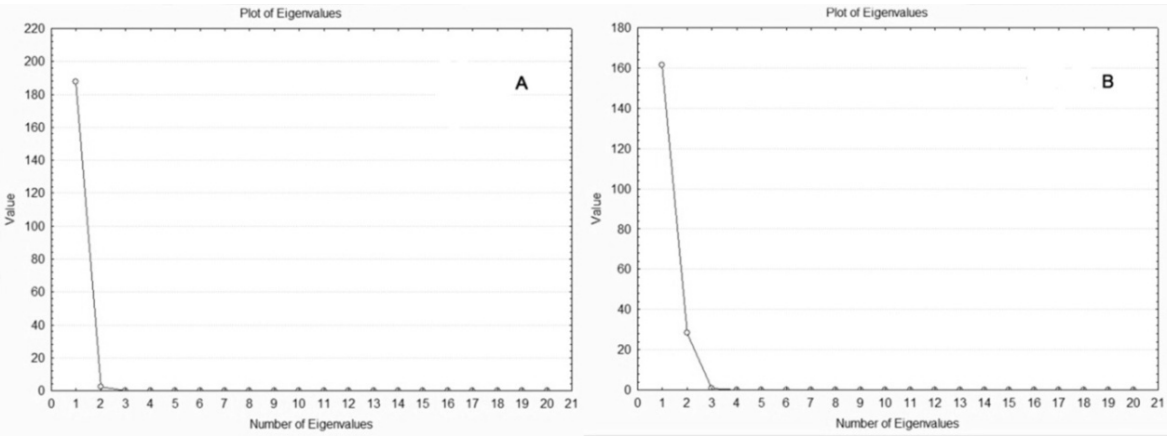
Slika 4.8. Grafička analiza prikazanih spektara na slici 4.7. preko matrične metode. Primenjen je test za dve apsorbujuće čestice, i' = 240 nm i j' = prvi scan (♦ = 280 nm, ■ = 320 nm, ▲ = 360 nm, × = 400 nm, * = 440 nm).

Detaljna analiza UV/Vis spektralnih podataka izvršena je primenom MCR-ALS metode. Prvi korak bilo je konstruisanje matrica $\boldsymbol{D}$ po principima definisanim u poglavlju 2.4.1.2. Sledeći korak je bilo određivanje jedinstvenih vrednosti (*singular values*) primenom SVD. Tabela 4.1. prikazuje jedinstvene vrednosti dobijene primenom SVD za procese autooksidacije pirogalola na obe pH vrednosti. Podaci za jedinstvene vrednosti za proces na pH 7,4 pokazuju da proces na ovoj pH vrednosti prati jednostavan mehanizam sa dve apsorbujuće čestice. Iz toga sledi da su u matrici $\boldsymbol{D_A}$ značajne dve svojstvene vrednosti (*eigenvalue*). Takođe, podaci iz tabele 4.1. pokazuju da za $\boldsymbol{D_B}$ matricu koja odgovara procesu na pH vrednosti od 8,0 značajne tri svojstvene vrednosti. Ovo se može objasniti mogućim intermedijerom koji se javlja pri autooksidaciji na pH 8,0.

Tabela 4.1. Rang analiza matrica $\boldsymbol{D_A}$ i $\boldsymbol{D_B}$ (prikazano je prvih pet jedinstvenih vredosti).

Faktori	pH 7,4	pH 8,0
1	36,088	96,270
2	5,420	18,634
3	0,121	10,615
4	0,034	0,368
5	0,029	0,124

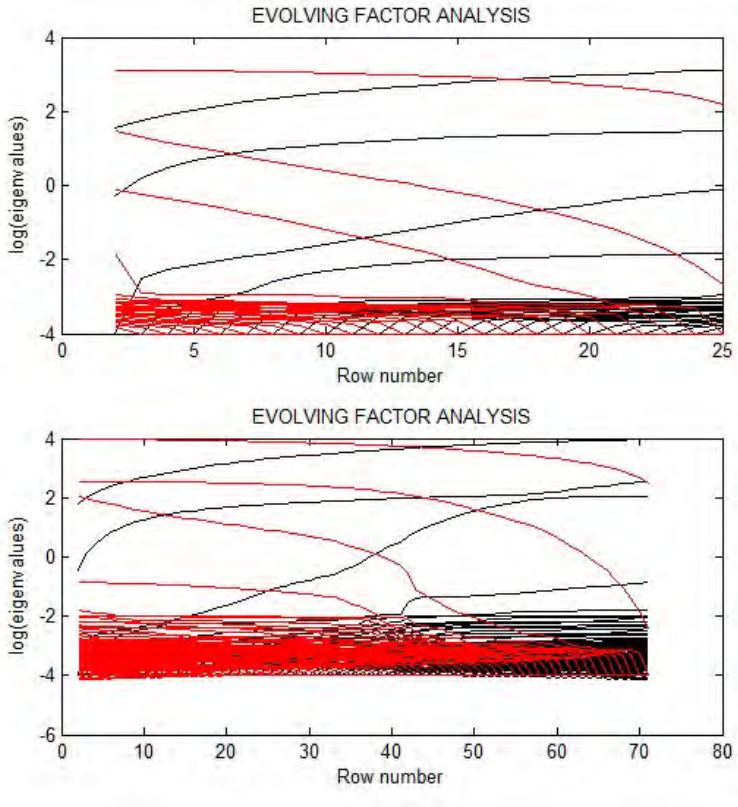
Za procenu ranga matrice apsorbanci primenjen je *scree plot* u faktorskoj analizi (FA). Rang matrice apsorbancija je jednak broju UV/Vis apsorbujućih čestica u smeši za vreme reakcije. Slika 4.9. prikazuje *scree plot* FA za proces autooksidacije pirogalola na obe pH vrednosti.



Slika 4.9. *Scree plot* u faktorskoj analizi (FA) za proces autooksidacije pirogalola (rastvor A - pH 7,4; rastvor B - pH 8,0).

Rezultati prikazani na slici 4.9. pokazuju da je za proces autooksidacije pirogalola na pH 7,4 rang apsorpcione matrice dva, a za proces na pH 8,0 vrednost je tri. U skladu sa dobijenim rezultatima broj svojstvenih vrednosti je dva za proces na pH 7,4 i tri za proces na pH 8,0.

Slika 4.10. predstavlja EFA grafički prikaz za proces autooksidacije pirogalola na obe pH vrednosti. Analiza unapred procesa objašnjava promene u spektrima pomoću značajnih faktora. Broj značajnih faktora sadrži informacije o evoluciji spektara za vreme procesa autooksidacije i taj broj je jednak broju nezavisnih reakcija +1 ili broju apsorbujućih čestica koje doprinose analiziranim spektrima. Analiza unapred i unazad procesa na pH 7,4 pokazuje da je na početku i kraju procesa prisutna jedna apsorbujuća čestica, a za ostalo vreme dve apsorbujuće čestice.



Slika 4.10. EFA grafički prikaz matrica spektralnih podaka ($\boldsymbol{D_A}$ iznad, $\boldsymbol{D_B}$ ispod). Pravci analize unapred (crne linije) i unazad (crvene linije) analize.

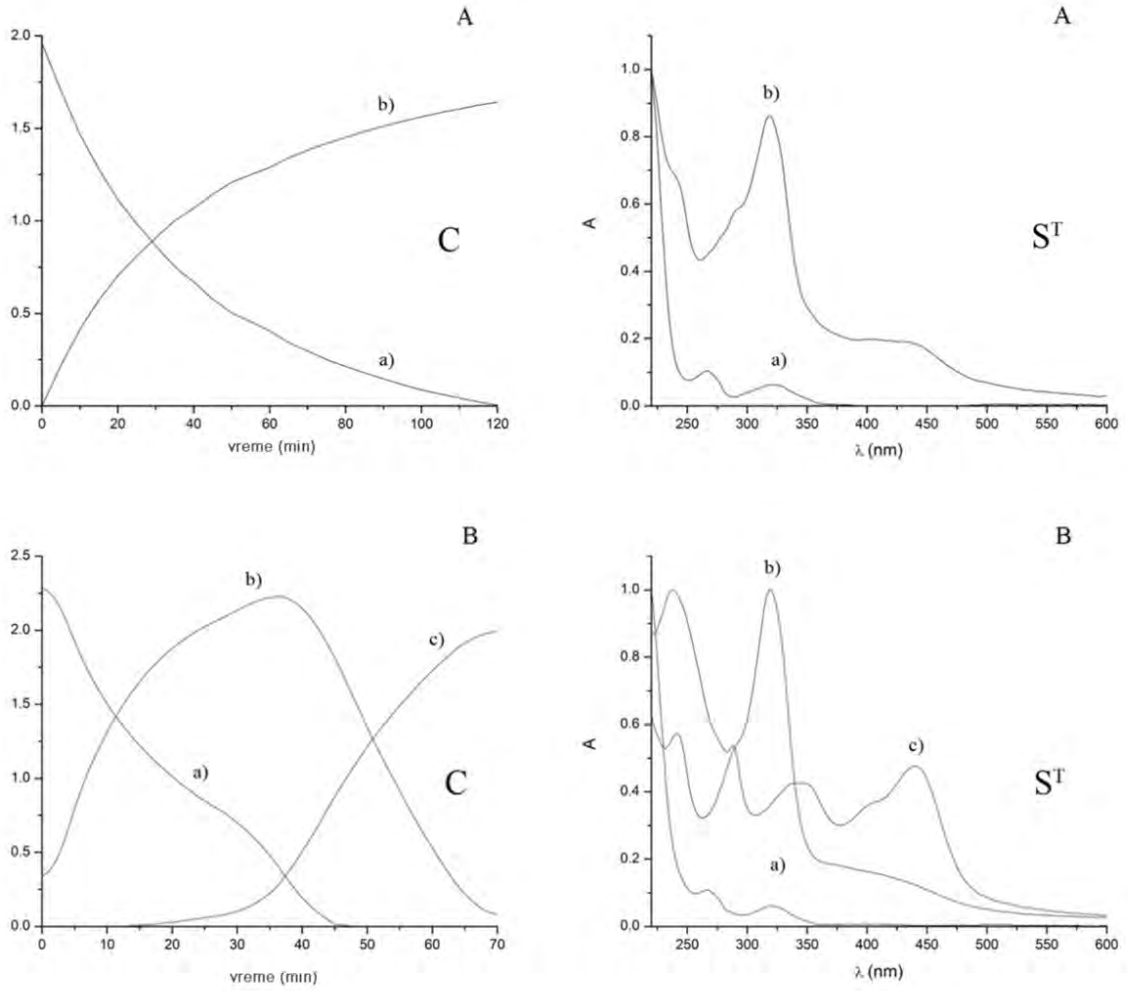
Analiza unapred podataka procesa autooksidacije na pH 7,4 pokazuje da se promene spektralnih podataka na samom početku procesa autooksidacije mogu objasniti preko dva faktora. Prisustvo dva faktora od samog početka reakcije može se povezati sa prisustvom dva jedinjenja u reakciji u kojoj dolazi do autooksidacije pirogalola, a to su pirogalol i prvi proizvod njegove autooksidacije. Nakon 35-40 minuta reakcije novi faktor postaje relevantan,

ukazujući da se pojavila još jedna čestica koja apsorbuje u UV/Vis oblasti. Nakon 45 minuta broj značajnih faktora ima istu vrednost kao i na početku reakcije. Iste informacije se dobijaju i pomoću analize unazad matrice $\boldsymbol{D_B}$.

Vrednosti dobijene iz *scree* grafičkog prikaza svojstvenih vrednosti u FA analizi i EFA grafički prikaz su identični (*log of eigenvalues* korišćen u ALS) i iznose dva i tri za matrice $\boldsymbol{D_A}$ i $\boldsymbol{D_B}$. Dodatne informacije o jedinjenjima koja su uključena u proces autooksidacije se mogu dobiti primenom MCR-ALS analize matrica $\boldsymbol{D_A}$ i $\boldsymbol{D_B}$.

Eksperimentalni podaci su obrađeni korišćenjem *soft* MCR-ALS metode primenom uslova ne-negativnosti (za koncentraciju i apsorbancu) i jednoznačnosti (za koncentracijone profile). Primena MCR-ALS metode je izdvojila dve čestice za rastvor A i tri za rastvor B. Vrednost LOF% za oba procesa je bila niža od 1%. Kvalitet razdvajanja se može proceniti korišćenjem standardne devijacije ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke (0,0135 za rastvor A; 0,0042 za rastvor B), greške fitovanja (0,681% za rastvor A; 0,019% za rastvor B) i objašnjene varijanse (99,934% za rastvor A; 99,998% za rastvor B).

Slika 4.11. prikazuje izračunate koncentracione profile ($\boldsymbol{C}$) i odgovarajuće izdvojene spektre pojedinačnih komponenti ($\boldsymbol{S}^{\mathrm{T}}$) za dva procesa autooksidacije na različitim pH vrednostima.

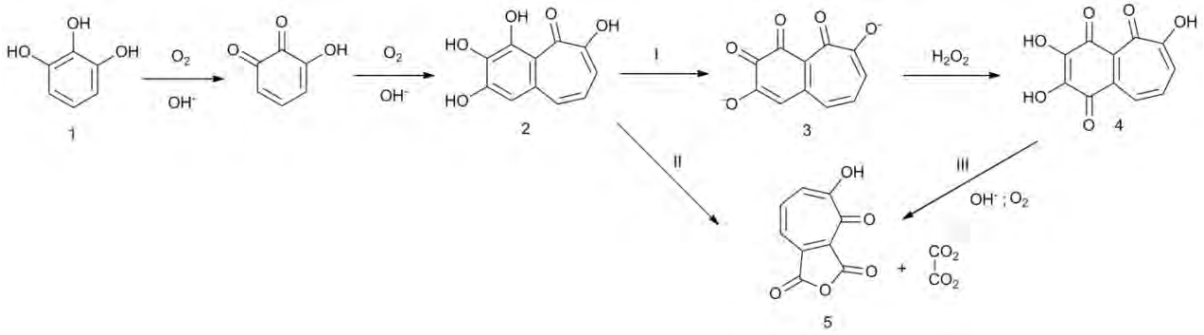


Slika 4.11. MCR-ALS metodom dobijeni kinetički profili (***C***) i odgovarajući spektri pojedinačnih komponenti (***S***$^{\mathbf{T}}$): A (C(PG) = 300 μmol dm^{-3}, pH 7,4) i rastvor B (C(PG) = 300 μmol dm^{-3}, pH 8,0).

U rastvoru A je detektovan samo jedan autooksidacioni proizvod. Spektar za supstancu b) iz rastvora A sa slike 4.11. je veoma sličan spektrima purpurogalina koji su prikazani u literaturi [Miyazaki *et al.*, 2004; Tauber, 1953]. Purpurogalin ima dva apsorpciona maksimuma u UV oblasi, na oko 270 i 320 nm, i apsorpcioni maksimum u vidljivom delu spektra na oko 425 nm. Primenom MCR-ALS metode dobijeni su koncentracioni profili za jedinjenja koja se javljaju u procesu autooksidacije pirogalola na pH 7,4. U toku ovog procesa dolazi do konstantnog opadanja koncentracije pirogalola i povećanja koncentracije proizvoda autooksidacije, najverovatnije purpurogalina. Dobijeni koncentracioni profili prikazani na slici 4.11. za rastvor A ukazuju da proces autooksidacije pirogalola na pH 7,4 prati jednostavnu kinetiku prvog reda. Međutim, tačna vrednost konstante brzine reakcije se ne može dobiti primenom *soft* MCR-ALS metode.

Primena MCR-ALS metode pokazuje da se povećanjem pH na 8,0 menja način odvijanja procesa autooksidacije pirogalola jer su koncentracioni profili i spektri pojedinačnih komponenti koje učestvuju u procesu autooksidacije različiti u odnosu na proces autooksidacije pirogalola na pH 7,4. Rezultati MCR-ALS analize za rastvor B su prikazani na slici 4.8 i ukazuju na prisustvo tri apsorbujuće čestice u toku procesa. Supstanca a) je pirogalol čija koncentracija konstantno opada za vreme trajanja procesa. Supstanca b) je najverovatnije purpurogalin pošto je UV/Vis spektar te supstance gotovo identičan spektrima purpurogalina navedenim u literaturi [Miyazaki*et al.*, 2004; Tauber, 1953]. Koncentracija ove supstance postiže maksimalnu vrednost na oko 35 minuta od početka procesa autooksidacije, a nakon toga počinje da opada i posle 70 minuta je približno jednaka nuli. Nova komponenta (supstanca c) se pojavljuje oko 30 minuta nakon početka procesa autooksidacije i njena koncentracija se konstantno povećava u celokupnom vremenskom intervalu praćenja procesa. Prikazani koncentracioni profili ukazuju da se u rastvoru A odigrava jedna reakcija prvog reda, a u rastvoru B dve konsenkutivne reakcije prvog reda. Ova analiza međutim ne isključuje mogućnost pojave smeše međuproizvoda koje MCR-ALS metoda identifikuje kao jednu komponentu.

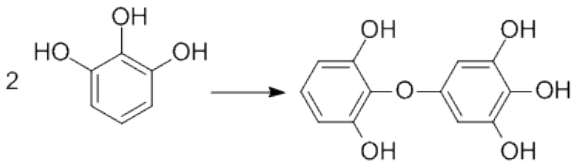
Smanjenje koncentracije purpurogalina u rastvoru B i pojava novih jedinjenja može se pripisati daljoj autooksidaciji purpurogalina. Neki od reakcionih mehanizama koji su navedeni u literaturi su prikazani na šemi 4.1. [Abrash *et al.*, 1989; Collier, 1966]. Početna autooksidacija pirogalola (1) se odvija preko hinona do purpurogalina (2). Jedan od puteva daljeg toka autooksidacije je formiranje para-hinona (4) preko dianjona purpurogalohinona (I). Drugi put (II) predlaže dalju oksidaciju do tropolon-αβ-anhidrida (5). Oksidacija do tropolon-αβ-anhidrida (5) može ići i preko para-hinona ali prateći drugačiji mehanizam (III). Dalji tok procesa autooksidacije uključuje mogućnost reakcije između pirogalola i semihinonskog radikala purpurogalina ili polimerizaciju purpurogailna [Abrash *et al.*, 1989; Collier, 1966].



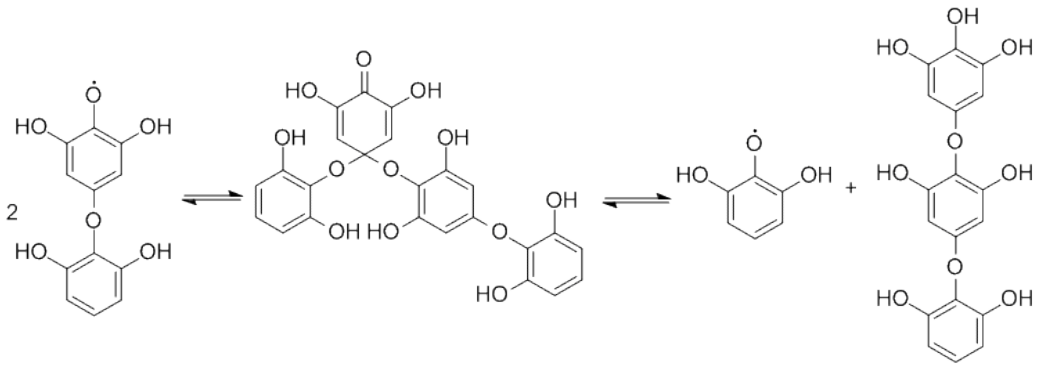
Šema 4.1. Predloženi tok reakcije autooksidacije pirogalola u baznim vodenim rastvorima.

Jedan od dokaza formiranja semihinona je pojava plave boje [Collier, 1966] što nije uočeno u toku procesa autooksidacije pirogalola na pH 8,0. Iz tog razloga su pri razmatranju procesa autooksidacije na pH 8,0 isključeni svi mehanizmi u kojim dolazi do formiranja semihinona. Koncentracioni profili prikazani na slici 4.8 za rastvor B ukazuju da je nakon 45 minuta od početka reakcije sav pirogalol izreagovao, a da koncentracija supstance c) konstantno raste u celokupnom ispitivanom vremenskom intervalu. Ove činjenice ukazuju da se reakcija između pirogalola i semihinoskog radikala ne odigrava pod ovim uslovima u navedenom vremenskom intervalu. Reakcioni mehanizam II sa šeme 4.1., oksidacija do tropolon-αβ-anhidrida, predviđa formiranje oksalne kiseline kao nusproizvoda. Literaturni podaci pokazuju da oksalna kiselina ima sposobnost apsorpcije u UV oblasi [Back, 1984; Lund Myhre & Nielsen, 2004], tako da bi je MCR-ALS metoda morala identifikovati kao nezavisnu česticu. Međutim, prikazani rezultati pokazuju prisustvo dve čestice od 60 minuta, purpurogalina i supstance c). Ove reakcije nisu elementarne, već niz reakcija u kojima se jedna supstanca pretvara u drugu i njihov mehanizam se ne može potpuno objasniti na osnovu raspoloživih podataka. Koncentracioni profili sa slike 4.8. za rastvore A i B pokazuju da sa se povećanjem pH prvi korak u procesu autooksidacije pirogalola, formiranje purpurogalina, ubrzava. MCR-ALS metoda ne može da pruži potpuni odgovor ali autooksidacija pirogalola na pH 8,0 najverovatnije teče bez formiranja tropolon-αβ-anhidrida uz moguće formiranje polimera [Veselinović *et al.*, 2012].

Pored građenja hinona kao prvog autooksidacionog proizvoda i purpurogalina, pirogalol je sposoban da ulazi u reakcije dimerizacije (polimerizacije) (reakcije 4.1. i 4.2.).

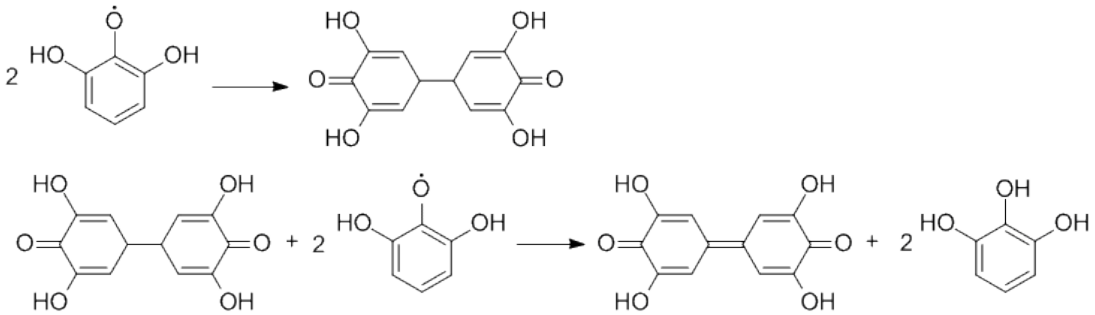


(4.1.)



(4.2.)

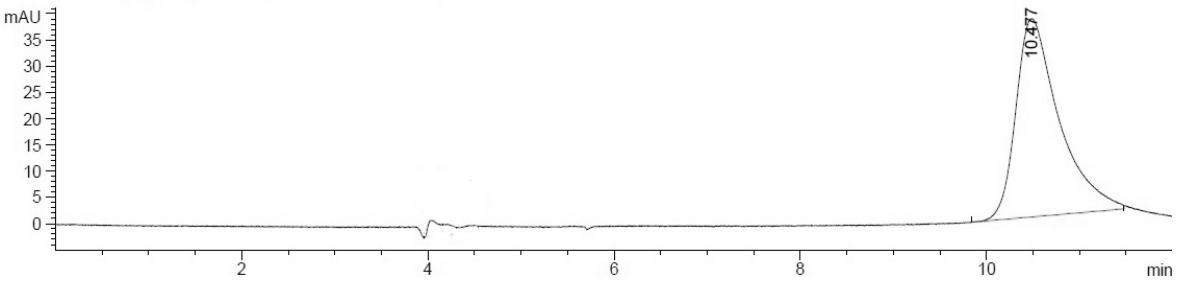
Pored mogućnosti da međusobno nagrade C-O dimer, molekuli pirogalola mogu da grade i C-C dimere. Na šemi 4.2. prikazane su reakcije građenja C-C dimera i dalja autooksidacija do dimera sa hinonskom strukturom.



Šema 4.2. Reakcije građenja C-C dimera pirogalola i odgovarajućeg hinona

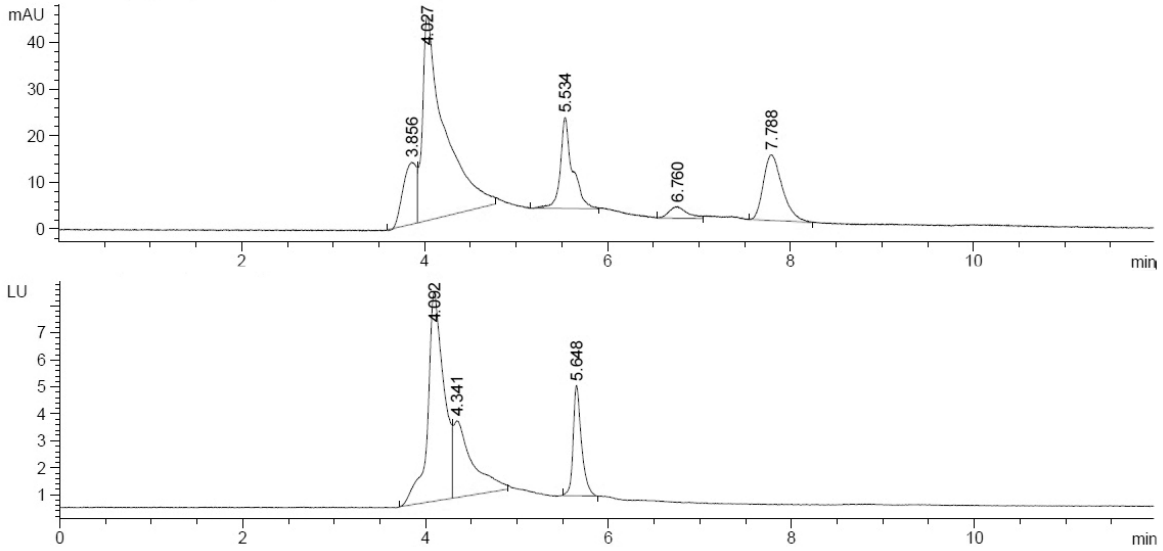
4.1.1.2. HPLC-DAD i HPLC-FL analiza

Na slici 4.12. prikazan je hromatogram rastvora pirogalola na pH 7,0 snimiljen odmah nakon pripreme. Prikazani hromatogram se može tretirati i kao hromatogram čistog pirogalola zato što proces autooksidacije nije započeo i može se uočiti samo jedan hromatografski pik na retencionom vremenu (RT) od 10,447 minuta.



Slika 4.12. HPLC hromatogram vodenog rastvora pirogalola na pH 7,0 (detekciona talasna dužina iznosi 350 nm)

Slika 4.13. prikazuje hromatograme vodenog rastvora pirogalola na pH 8,0 nakon vremena autooksidacije od 24 h.



Slika 4.13. HPLC hromatogram proizvoda autooksidacije pirogalola na pH 8,0: gore) DAD detektor - detekciona talasna dužina 350 nm; dole) FL detektor - ekscitaciona talasna dužina 250 nm, a emisiona 450 nm.

Hromatogram dobijen korišćenjem DAD detektora pokazuje prisustvo 5 pikova koji odgovaraju različitim autooksidacionim proizvodima koji se javljaju na RT: 3,856; 4,027; 5,534; 6,760 i 7,788 min. Hromatogram dobijen korišćenjem FL detektora pokazuje tri jedinjenja sa RT od 4,092; 4,341 i 5,648 min. Upoređujući ova dva hromatograma uočava se da su dva jedinjenja uočena kod oba tipa detekcije, jedinjenja sa RT od 4,027 i 5,534 min. Jedinjenje sa RT od 4,341 min u FL detekciji se ne javlja kao poseban pik u DAD detekciji, mada se ne može isključiti sposobnost navedenog jedinjenja da apsorbuje na 350 nm jer se u tom delu hromatograma nalazi ”rep” (*tail*) koji ga prekriva.

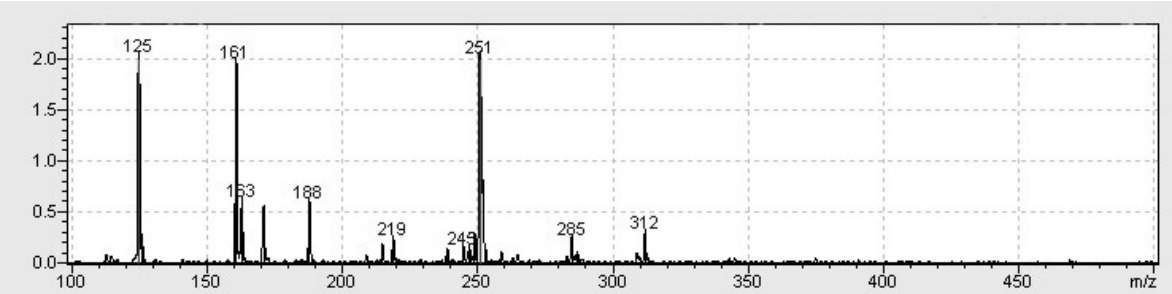
Tri jedinjenja koja su registrovana DAD detektorom sa TR vrednostima od 5,534; 6,760 i 7,788 minuta nemaju mogućnost fluorscencije. Ovo se može objasniti eventualnim nastajanjem proizvoda autooksidacije pirogalola kod kojih je došlo do raskidanja veza u prstenu čime bi se formirali manji molekuli koji apsorbuju u UV oblasti ali nemaju mogućnost fluorescencije.

MCR-ALS metodom je isključeno formiranje purpurogalina kao jedinog autooksidacionog proizvoda pirogalola na pH 8,0 što upućuje na pretpostavku o dimerizaciji i eventualnoj polimerizaciji pirogalola. Rezultati prikazani na Slici 4.10. daju dalju potvrdu ove tvrdnje.

Nakon 24 h trajanja procesa autooksidacije dobijaju se jedinjenja koja su polarnija u odnosu na pirogalol i koja imaju manja retenciona vremena. Manje vrednosti RT proizvoda autooksidacije ukazuju da su nastala jedinjenja koja su polarnija u odnosu na pirogalol jer je korišćen sistem reverznih faza. Ova činjenica takođe ide u prilog pretpostavci da su mogući proizvodi autooksidacije pri navedenim uslovima neki od polimera. Međutim, HPLC analizom uz primenu DAD i fluorescentne detekcije se ne može dobiti odgovor koji polimeri i u kojoj meri su zastupljeni.

4.1.1.3. ESI-MS analiza

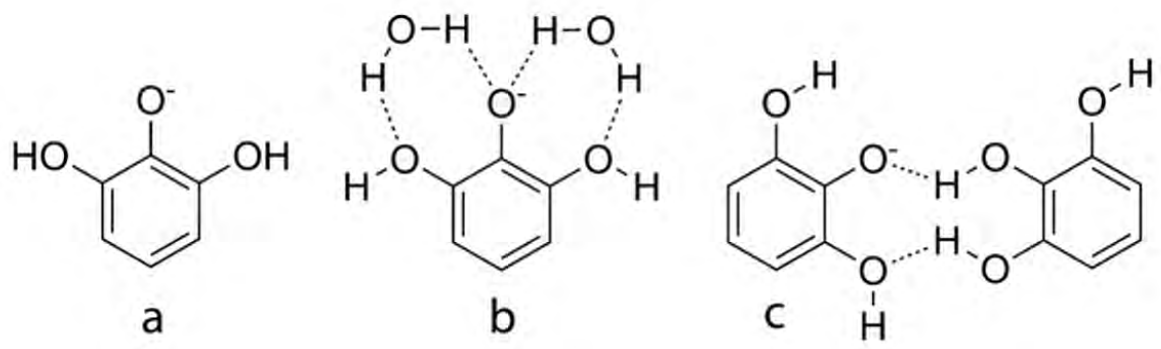
Na Slici 4.14. prikazan je maseni spektar pirogalola u vodenom rastvoru na pH 7,0 odmah nakon pripreme.



Slika 4.14. MS spektar rastvora pirogalola na pH 7,0. Vreme autooksidacije 0 min.

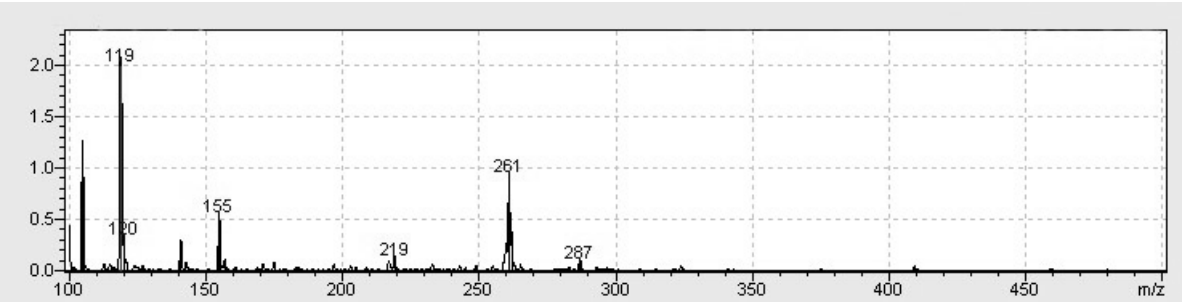
U ESI-MS spektru pirogalola pre početka autooksidacije pojavljuje se veći broj jona, a dva najkarakterističnija su joni sa m/z vrednostima 125 i 251. Jon na m/z vrednosti 125 je molekulski $[PG - H]^-$ jon pirogalola nastao odlaskom H^+ jona iz molekula pirogalola dok je jon na m/z vrednosti 251 najverovatnije $[2PG - H]^-$ jon u kome su dva molekula pirogalola povezana sa dve vodonične veze. Zbog relativno visoke koncentracije pirogalola u rastvoru može se očekivati građenje adukata (asocijata) između molekula pirogalola međusobno ili sa molekulima rastvarača u većem obimu. Tako bi, na primer, jon na m/z vrednosti 161 mogao da bude dvostruko hidratisani $[PG+2H_2O - H]^-$ jon. Osim toga, može se očekivati i pojava dvostruko naelektrisanih jona, adukata koji sadrže veći broj molekula pirogalola međusobno povezanih vodoničnim vezama, pa bi se prisustvo jona na m/z vrednosti 188 mogla pripisati građenju $[3PG - 2H]^{2-}$ jona, a prisustvo jona na m/z vrednosti 312 građenju $[5PG - 2H]^{2-}$ jona. U prikazanom spektru se može uočiti i prisustvo jona na m/z vrednosti 219 koji najverovatnije potiče od purpurogalina ($[PUR - H]^-$ jon) koji se kao nečistoća nalazi u

pirogalolu koji je korišćen za pripremanje rastvora. Neki od navedenih jona prikazani su na slici 4.15.



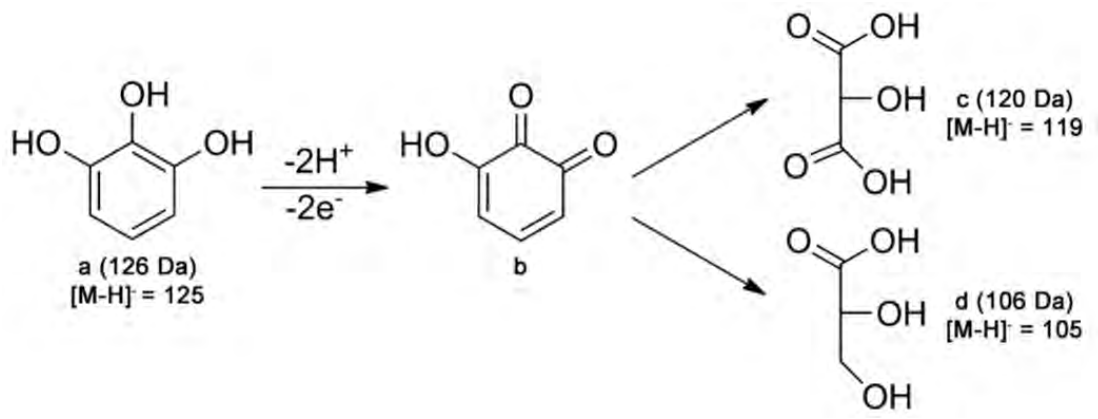
Slika 4.15. Struktura nekih karakterističnih jona detektovanih pomoću ESI-MS: a) $[PG - H]^-$ (m/z = 125), b) $[PG+2H_2O - H]^-$ (m/z = 161) i c) $[2PG - H]^-$ (m/z = 251).

Na slici 4.16. prikazan je maseni spektar proizvoda autooksidacije pirogalola u vodenom rastvoru na pH 8,5 snimljen nakon 4 časa stajanja rastvora.



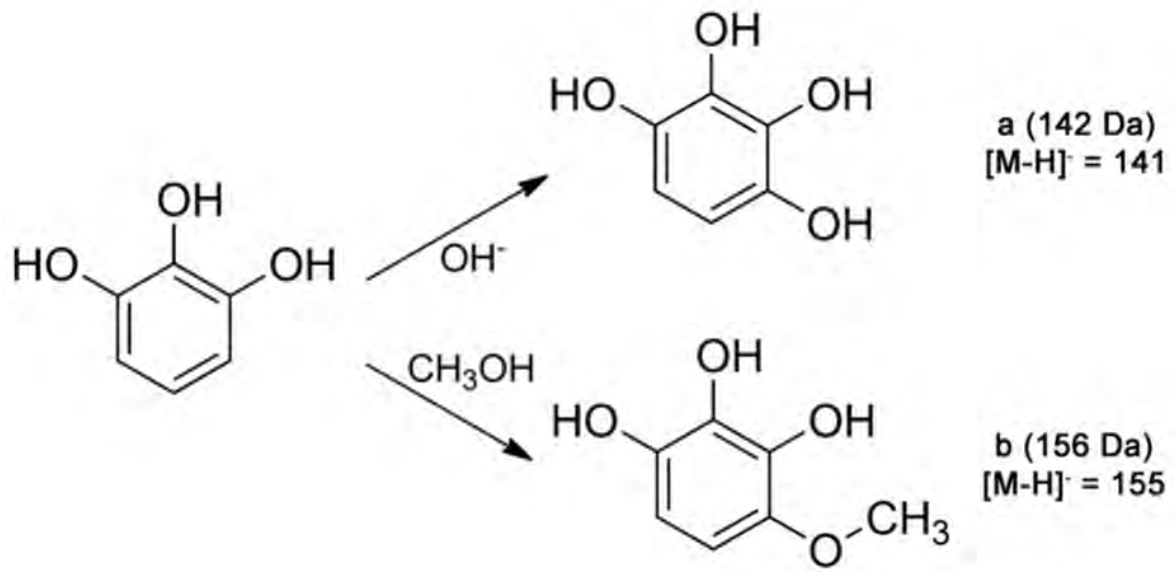
Slika 4.16. ESI-MS spektar proizvoda autooksidacije pirogalola u vodenom rastvoru na pH 8,5. Vreme autooksidacije 4 časa.

U prikazanom spektru se uočava nekoliko pikova od kojih je najintezivniji onaj sa m/z odnosom 119. Najuočljivija karakteristika ovog spektra je potpuno odsustvo $[PG - H]^-$ jona na m/z vrednosti 125 što ukazuje da je u toku autooksidacije došlo do potpune transformacije pirogalola u druga jedinjenja. Pikovi koji potiču od jona sa m/z vrednostima manjim od 125 očigledno predstavljaju proizvode degradacije pirogalola pri čemu se može pretpostaviti da je u toku procesa autooksidacije pirogalola najpre došlo do nastajanja odgovarajućeg hinona, a zatim do njegove razgradnje. Mogući mehanizmi ovih transformacija prikazani su na šemi 4.3.



Šema 4.3. Mogući mehanizmi razgradnje pirogalola.

Prisustvo signala koji potiče od jona sa m/z vrednošću 141 može se objasniti uz pretpostavku da je u toku autooksidacije pirogalola došlo do vezivanja još jedne hidroksilne grupe za benzenov prsten što je u literaturi prikazano kao početna faza katalitičke degradacije fenola u vodenom rastvoru [Moura *et al.*, 2006]. Kako je u toku injektovanja vodenog rastvora pirogalola kao solvent korišćen metanol, moguće je da je u jonizacionoj komori došlo do vezivanja metoksi grupe za pirogalol čime bi se moglo objasniti prisustvo signala koji potiče od jona sa m/z vrednošću 155. Nastajanje ovih proizvoda prikazano je na šemi 4.4.



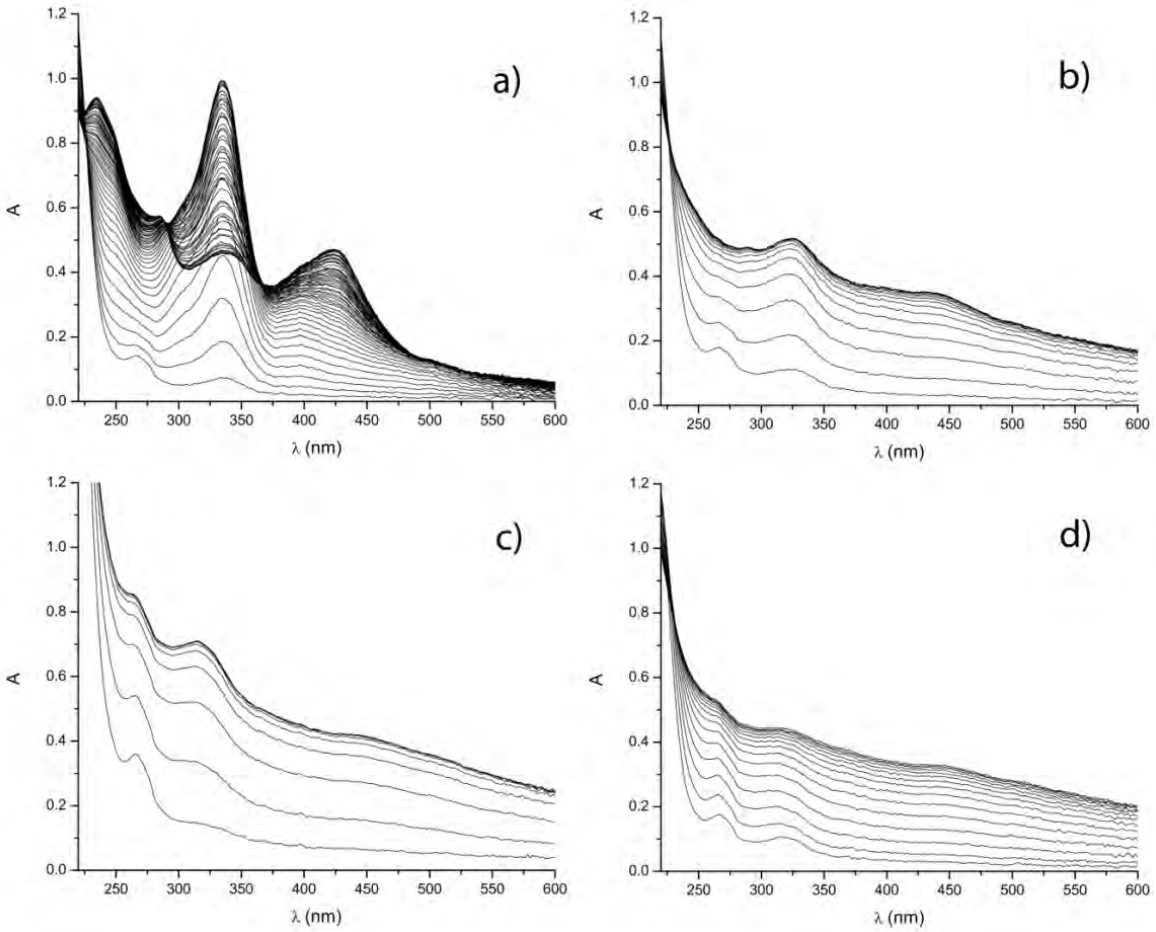
Šema 4.4. Moguće transformacije pirogalola.

Za prisustvo signala koji potiče od jona sa m/z vrednošću 261 za sada nema zadovoljavajućeg objašnjenja.

4.1.2. Autooksidacija pirogalola u prisustvu dvovalentnih dijamagnetnih jona zemnoalkalnih metala

4.1.2.1. UV/Vis spektralna analiza

Na slici 4.17. su prikazani UV/Vis spektri snimljeni tokom autooksidacije pirogalola u vodenom rastvoru na pH 7,4 (fiziološka pH vrednost) u prisustvu dvovalentnih dijamagnetnih metalnih jona: a) Mg(II), b) Ca(II), c) Sr(II) i d) Ba(II). Različiti spektralni profili koji se mogu uočiti u ova četri slučaja potvrđuju zavisnost autooksidacije pirogalola od vrste metalnog jona. Spektralni profil procesa autooksidacije pirogalola u prisustvu Mg(II) jona je kompleksniji u odnosu na ostale procese sa mogućim formiranjem više autooksidacionih proizvoda. Vizuelno poređenje spektara dobijenih prilikom autooksidacije u prisustvu Mg(II) jona pokazuje da je proces veoma sličan procesu autooksidacije pirogalola na pH 8,0 bez prisustva metalnih jona. Spektri dobijeni prilikom autooksidacije pirogalola u prisustvu Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona pokazuju međusobnu sličnost i dosta se razlikuju u odnosu na spektre dobijene prilikom autooksidacije pirogalola u prisustvu Mg(II) jona i spektre dobijene prilikom autooksidacije pirogalola na pH 7,4 i 8,0 bez prisustva metalnih jona što upućuje na postojanje drugačijeg mehanizma autooksidacije.



Slika 4.17. UV/Vis spektri snimljeni u toku procesa autooksidacije pirogalola (C(PG) = 300 μmol dm^{-3}, pH 7,4, C(M(II)) = 0,1 mol dm^{-3}: a) u prisustvu Mg(II) jona (vremenski interval snimanja 1 minut); b) u prisustvu Ca(II) jona, c) u prisustvu Sr(II) jona i d) u prisustvu Ba(II) jona (vremenski interval snimanja 5 minuta).

Može se pretpostaviti da Mg(II) joni usled kompleksiranja sa polihidroksilnim fenolima povećavaju kiselost hidroksilnih grupa i olakšavaju odlazak hidronijum jona. Zbog toga je moguće da autooksidacija pirogalola na pH 7,4 u prisustvu Mg(II) jona ima analogan mehanizam kao autooksidacija pirogalola na pH 8,0 bez prisustva metalnih jona. Joni Ca(II), Sr(II) i Ba(II) zbog značajno većeg jonskog radijusa nemaju izraženu tu osobinu pa se zato autooksidacija odvija prema drugačijem mehanizmu.

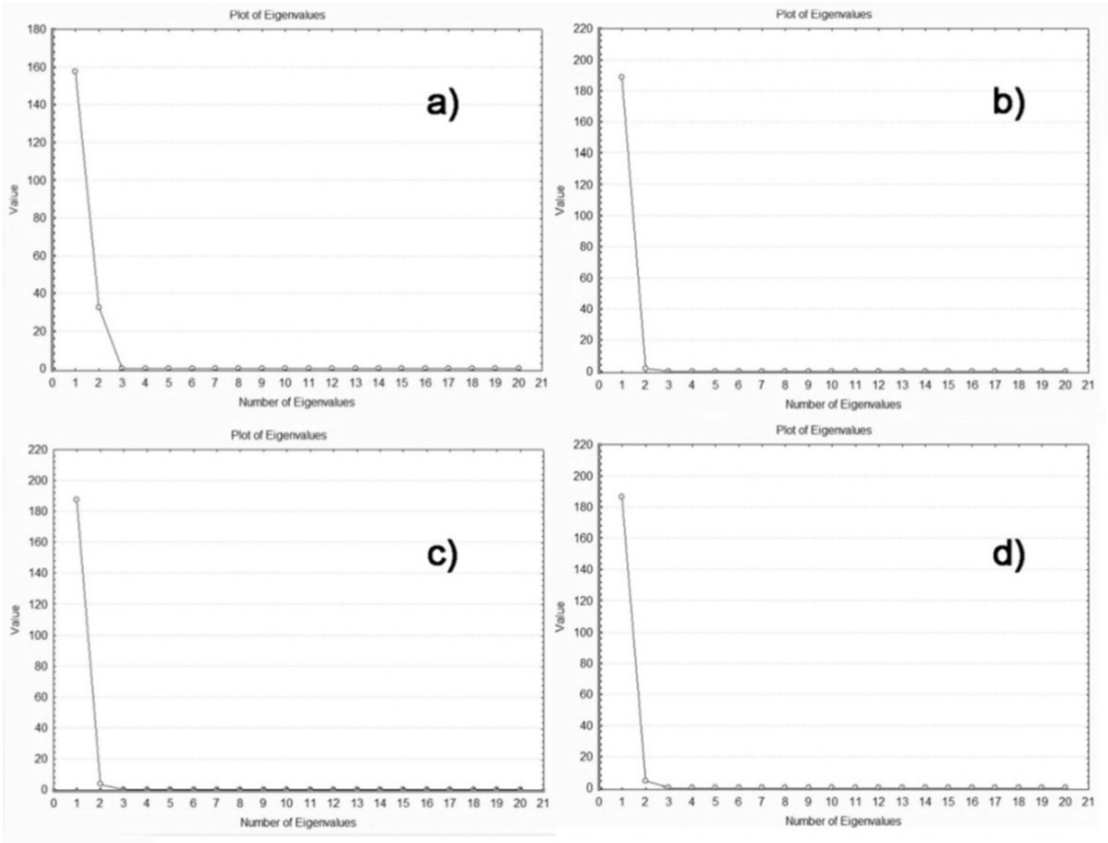
Grafička analiza snimljenih spektara matričnom metodom pokazala je da se u sistemima u kojima su prisutni Ca(II), Sr(II) i Ba (II) joni u toku procesa autooksidacije pirogalola na pH 7,4 javljaju dve čestice u ravnoteži, dok se u sistemu sa Mg(II) jonima javlja veći broj čestica.

Radi detaljnije analize procesa primenjena je MCR-ALS metoda. Prvi korak bilo je konstruisanje matrica $\boldsymbol{D}$ po principima definisanim u Poglavlju 2.4.1.2. Sledeći korak bio je određivanje jedinstvenih vrednosti primenom SVD. Tabela 4.2. prikazuje jedinstvene vrednosti dobijene primenom SVD za procese autooksidacije pirogalola u prisustvu Mg(II), Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona. Podaci za jedinstvene vrednosti za procese u prisustvu Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona na pH 7,4 pokazuju da ovi procesi prate jednostavan mehanizam sa dve apsorbujuće čestice, u matricama $\boldsymbol{D_{Ca}}$, $\boldsymbol{D_{Sr}}$, $\boldsymbol{D_{Ba}}$ značajne su po dve svojstvene vrednosti. Podaci iz tabele 4.2. pokazuju da su u matrici $\boldsymbol{D_{Mg}}$ značajne tri svojstvene vrednosti. Ovo se može objasniti prisustvom intermedijera, koji se javlja kao i pri autooksidaciji pirogalola bez prisustva metalnih jona na pH 8,0.

Tabela 4.2. Analiza ranga matrica $\boldsymbol{D_{Mg}}$, $\boldsymbol{D_{Ca}}$, $\boldsymbol{D_{Sr}}$, $\boldsymbol{D_{Ba}}$, (prikazano je prvih pet jedinstvenih vrednosti).

Faktori	Mg	Ca	Sr	Ba
1	44,9618	20,1942	23,6023	17,7735
2	6,66959	2,56738	3,47471	3,09506
3	3,40955	0,288941	0,276437	0,249765
4	0,117474	0,060403	0,045347	0,027268
5	0,039552	0,025371	0,02807	0,023968

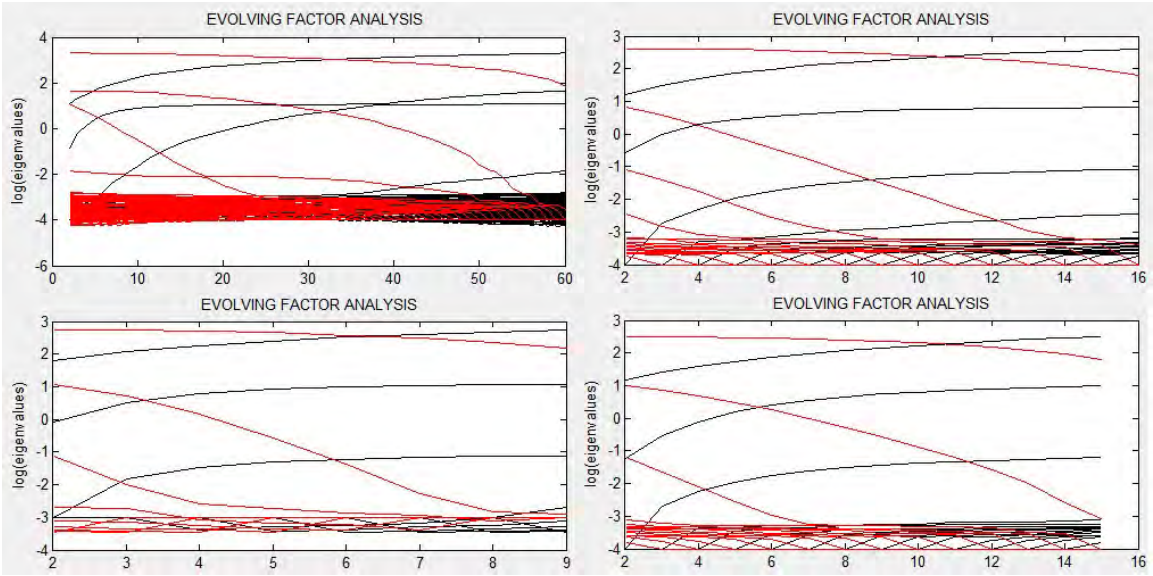
Za procenu ranga matrica apsorbancija primenjen je *scree* grafički prikaz u faktorskoj analizi (FA). Slika 4.14. prikazuje *scree* grafički prikaz za FA za procese autooksidacije pirogalola u prisustvu Mg(II), Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona.



Slika 4.18. *Scree* grafički prikaz za procese autooksidacije pirogalola na pH 7,4 u prisustvu: a) Mg(II), b) Ca(II), c) Sr(II) i d) Ba(II) jona.

Rezultati prikazani na slici 4.18. pokazuju da je za proces autooksidacije pirogalola na pH 7,4 u prisustvu Mg(II) jona rang matrice apsorbancija 3, a za proces na pH 7,4 u prisustvu Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona 2. U skladu sa dobijenim rezultatima broj jedinstvenih vrednosti je tri za proces na pH 7,4 u prisustvu Mg(II) jona i dva za procese u prisustvu Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona.

Slika 4.15. prikazuje EFA grafički prikaz za procese autooksidacije pirogalola u prisustvu Mg(II), Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona na pH 7,4. Analiza unapred podataka za procese autooksidacije na pH 7,4 u prisustvu Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona pokazuje da se promene spektralnih podataka od samog početka autooksidacije mogu objasniti preko dva faktora. Prisustvo dva faktora od samog početka reakcije može se povezati sa prisustvom dve apsorbujuće čestice u reakciji u kojoj dolazi do autooksidacije pirogalola. U slučaju matrice $\boldsymbol{D_{Mg}}$ nakon 10-15 minuta od početka reakcije novi faktor postaje relevantan, ukazujući da se pojavila nova čestica aktivna u UV/Vis oblasti. Nakon 45 minuta broj značajnih faktora je identičan kao i na početku reakcije. Iste informacije se dobijaju i pomoću analize unazad matrica $\boldsymbol{D_{Mg}}$, $\boldsymbol{D_{Ca}}$, $\boldsymbol{D_{Sr}}$, $\boldsymbol{D_{Ba}}$.



Slika 4.19. EFA grafički prikaz matrica spektralnih podataka (***D*$_{Mg}$** gore levo, ***D*$_{Ca}$** gore desno, ***D*$_{Sr}$** dole levo, ***D*$_{Ba}$** dole desno). Pravci analize: unapred (crne linije) i unazad (crvene linije).

Analiza unapred i unazad ***D*$_{Mg}$** matrice pokazuje prisustvo tri značajna faktora kao i u slučaju EFA matrice za proces autooksidacije pirogalola na pH 8,0 bez prisustva metalnih jona.

Rezultati dobijeni iz *scree* grafičkog prikaza (*eigenvalues*) u FA analizi i rezultati EFA grafičke analize (*log of eigenvalues* korišćen u ALS) su identični. Informacije o jedinjenjima koja su uključena u proces autooksidacije se mogu dobiti primenom MCR-ALS analize matrica ***D*$_{Mg}$**, ***D*$_{Ca}$**, ***D*$_{Sr}$** i ***D*$_{Ba}$**.

Eksperimentalni podaci su obrađeni korišćenjem *soft* MCR-ALS metode uz primenu uslova ne-negativnosti (za koncentraciju i spektre) i jednoznačnosti (za koncentracione profile). Primena MCR-ALS metode je ukazala na postojanje tri čestice za proces autooksidacije pirogalola u prisustvu Mg(II) jona i dve čestice za proces autooksidacije pirogalola u prisustvu Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona. Procenat LOF% za sva četri procesa je bio niži od 1%. Tabela 4.3. prikazuje procenu kvaliteta razdvajanja komponenti, korišćenjem standardne devijacije ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke, greške fitovanja i objašnjene varijance.

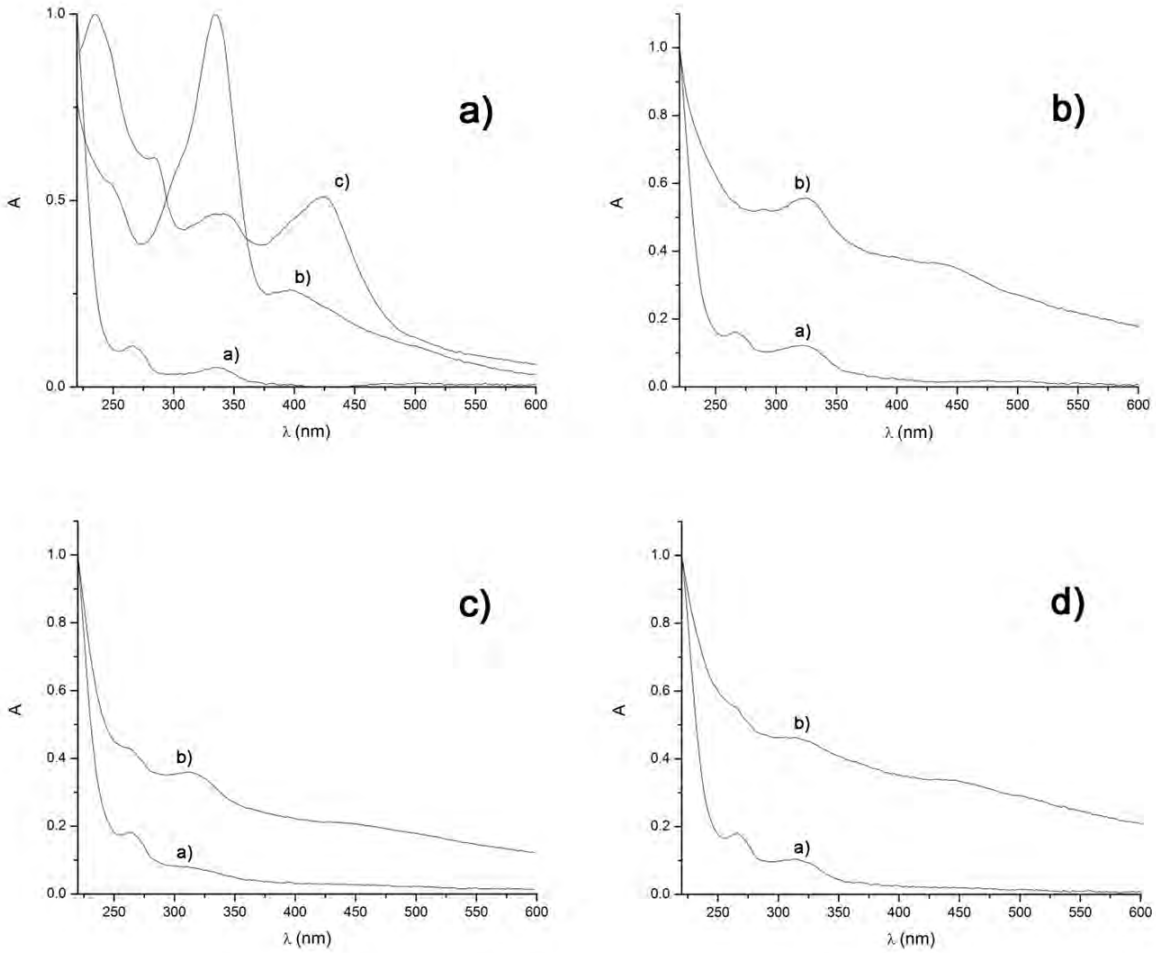
Tabela 4.3. Kvalitet razdvajanja komponenti procenjen korišćenjem standardne devijacije ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke, LOF% i objašnjene varijance.

	Mg	Ca	Sr	Ba
SdRex	0,001841	0,00547	0,00686	0,0048338
LOF% (PCA)	0,057425	$1,848\times10^{-12}$	$1,9\times10^{-13}$	$1,1215\times10^{-6}$
LOF% (exp)	0,43234	1,4852	1,1921	1,434
r^2	99,9981	99,9779	99,986	99,9794

SdRex – standardna devijacija ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke
LOF% – *lack-of-fit* za PCA i eksperiment
r^2 – procenat objašnjene varijance

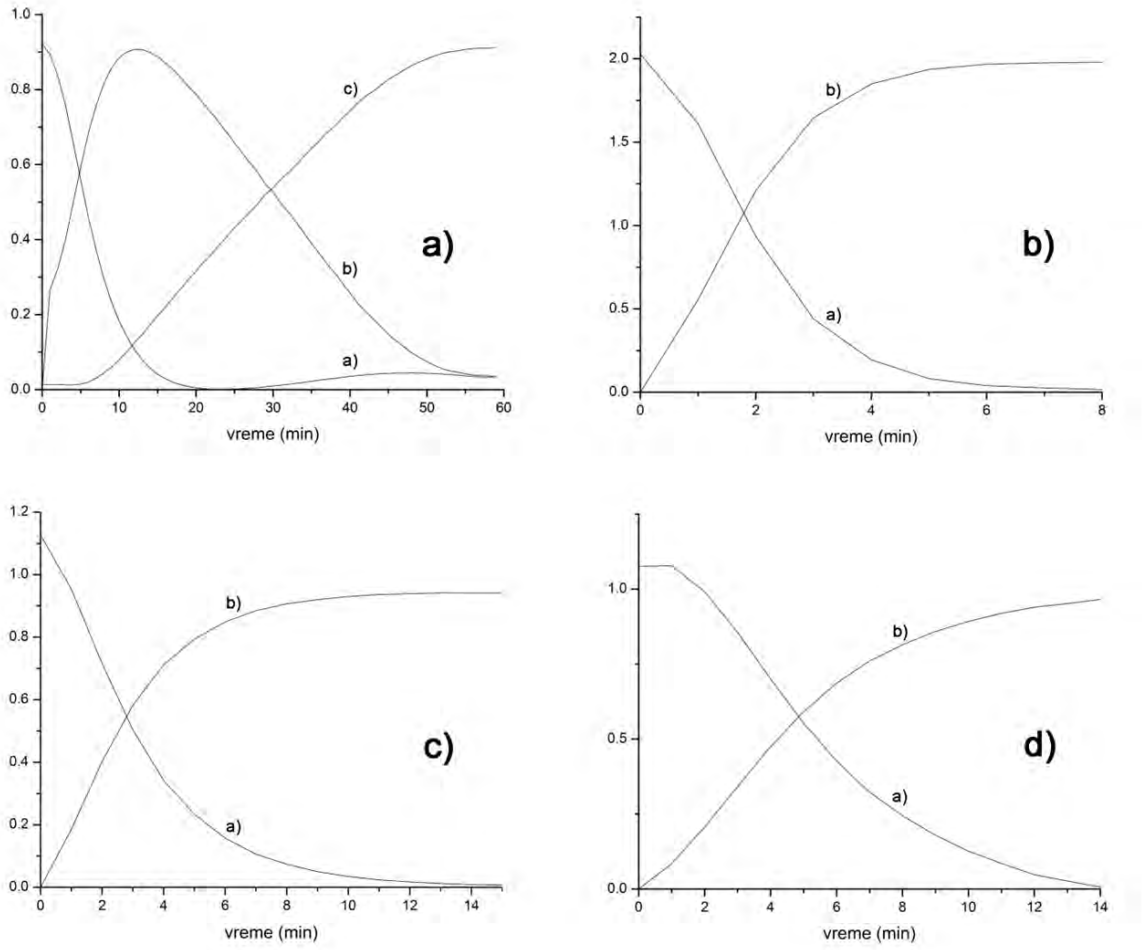
Slika 4.20. prikazuje odgovarajuće spektre pojedinačnih komponenti ($\boldsymbol{S}^T$) za procese autooksidacije na pH vrednosti od 7,4 u prisustvu jona a) Mg(II), b) Ca(II), c) Ba(II) i Sr(II), dok slika 4.21. prikazuje izračunate koncentracione profile (***C***) razdvojenih komponenti.

MCR-ALS analizom autooksidacije pirogalola u prisustvu Mg(II) jona dobijaju se vrlo slični rezultati za matricu spektara čistih učestvujućih komponenti u procesu kao kod autooksidacije pirogalola bez prisustva metalnih jona na pH 8,0. Proces autooksidacije odvija se najverovatnije preko formiranja purpurogalina (supstanca b na Slikama 4.20. a) i 4.21. a)) koji se dalje transformiše u novo jedinjenje. MCR-ALS metoda je omogućila i određivanje koncentracionih profila za sva jedinjenja u procesu autooksidacije. Koncentracija supstance b (najverovatnije purpurogalin) povećava se u toku prvih 10-15 minuta trajanja procesa, a zatim opada. Ubrzo nakon početka autooksidacije (nakon ~ 5 minuta) pojavljuje se i treća komponenta čija koncentracija raste i postaje približno konstantna kada se koncentracije supstance a i b smanje na minimalnu vrednost. U slučaju autooksidacije u prisustvu Mg(II) jona navedeni vremenski intervali su kraći u odnosu na vremenske intervale u toku procesa autooksidacije na pH 8,0 bez prisustva metalnih jona. Ovo ukazuje da prisustvo Mg(II) jona olakšava disocijaciju pirogalola jer ima isti efekat kao i povećanje pH vrednosti (proces autooksidacije se ubrzava uz skoro identičan mehanizam).



Slika 4.20. Spektri čistih komponenti ($\boldsymbol{S}^{\mathbf{T}}$) dobijeni MCR-ALS metodom za procese autooksidacije pirogalola u prisustvu: a) Mg(II), b) Ca(II), c) Sr(II) jona i d) Ba(II) jona.

U toku procesa autooksidacije na pH 7,4 u prisustvu jona Ca(II), Sr(II) i Ba(II) identifikovan je jedan proizvod autooksidacije za sva tri procesa (slika 4.16). Spektralne karakteristike proizvoda autooksidacije u prisustvu Sr(II) i Ba(II) jona su skoro identične dok se spektralne karakteristike proizvoda u prisustvu Ca(II) jona malo razlikuju. Krive promene koncentracija učestvujućih komponenti za ova tri procesa su prikazane na slici 4.17. Dobijeni koncentracioni profili ukazuju da se u ova tri slučaja osnovna razlika ispoljava u brzini procesa autooksidacije koja je najveća u prisustvu Ca(II) jona, a najmanja u prisustvu Ba(II) jona. Ovaj rezultat se može objasniti ako se ima u vidu porast jonskog poluprečnika u nizu r(Ca) < r(Sr) < r(Ba) što dovodi do smanjenja jonskog potencija (r/z) odgovarajućih jona i samim tim smanjenja uticaja na fizičko-hemijsko ponašanje pirogalola.



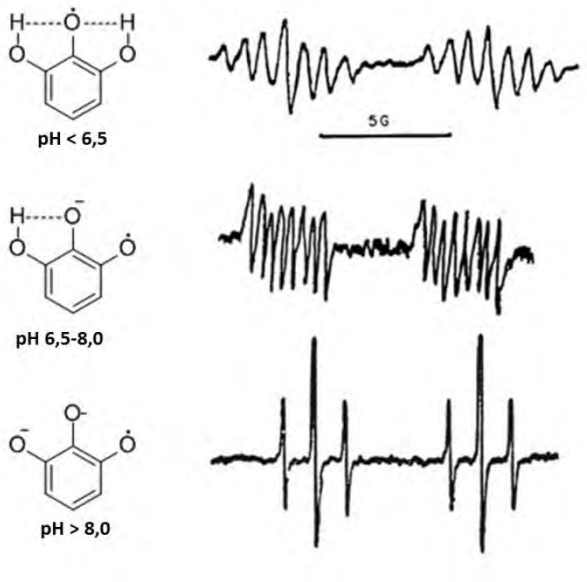
Slika 4.21. Koncentracioni profili (***C***) apsorbujućih čestica u toku procesa autooksidacije pirogalola na pH 7,4 u prisustvu: a) Mg(II), b) Ca(II), c) Sr(II) i d) Ba(II) jona određeni metodom MCR-ALS.

4.1.2.2. ESR analiza

Elektron spin rezonantna spektroskopija (ESR) (alternativno se naziva i elektron paramagnetna rezonantna spektroskopija ili EPR) je tehnika koja se često primenjuje za proučavanje oksidativnih procesa u biološkim sistemima i antioksidativnih karakteristika različitih jedinjenja [Spasojević *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011]. ESR spektroskopija se može koristiti za detekciju i karakterizaciju semihinonskih slobodnih radikala koji se formirju u toku autooksidacije mnogih fenolnih jedinjenja [Adams et al., 1958].

U zavisnosti od pH vrednosti sredine pirogalol može da nagradi različite slobodne radikale i dalji tok autooksidacije je zavistan od strukture početnih radikala. Na slici 4.22. prikazane su strukture slobodnih radikala koje pirogalol može da nagradi pri različitim pH vrednostima i

odgovarajući ESR spektri [Carrington & Smith, 1964; Smith & Carrington, 1967]. Uticaj pH vrednosti sistema se ogleda pre svega u broju disosovanih hidroksilnih grupa. Što je broj nedisosovanih hidroksilnih grupa veći, veći je i broj intramolekulskih vodoničnih veza. Ova interakcija se može uočiti i na odgovarajućim ESR spektrima, jer građenje intramolekulskih vodoničnoh veza otežava izmenu protona hidroksilnih grupa sa vodom kako rastvaračem pa njihove konstante hiperfinog cepanja imaju vrednosti znatno veće od širine spektralnih linija što se manifestuje pojavom većeg broja linija u ESR spektrima. Najmanji broj linija (dva tripleta) se može uočiti kod radikala dobijenog autooksidacijom na pH~14, kada su sve hidroksilne grupe disosovane. Veći broj linija može se uočiti u ESR spektrima radikala dobijenih u slabo kiseloj (pH < 6,5) i približno neutralnoj sredini (pH 6,5-8,0) oksidacijom pirogalola pomoću Ti^{3+} - H_2O_2.

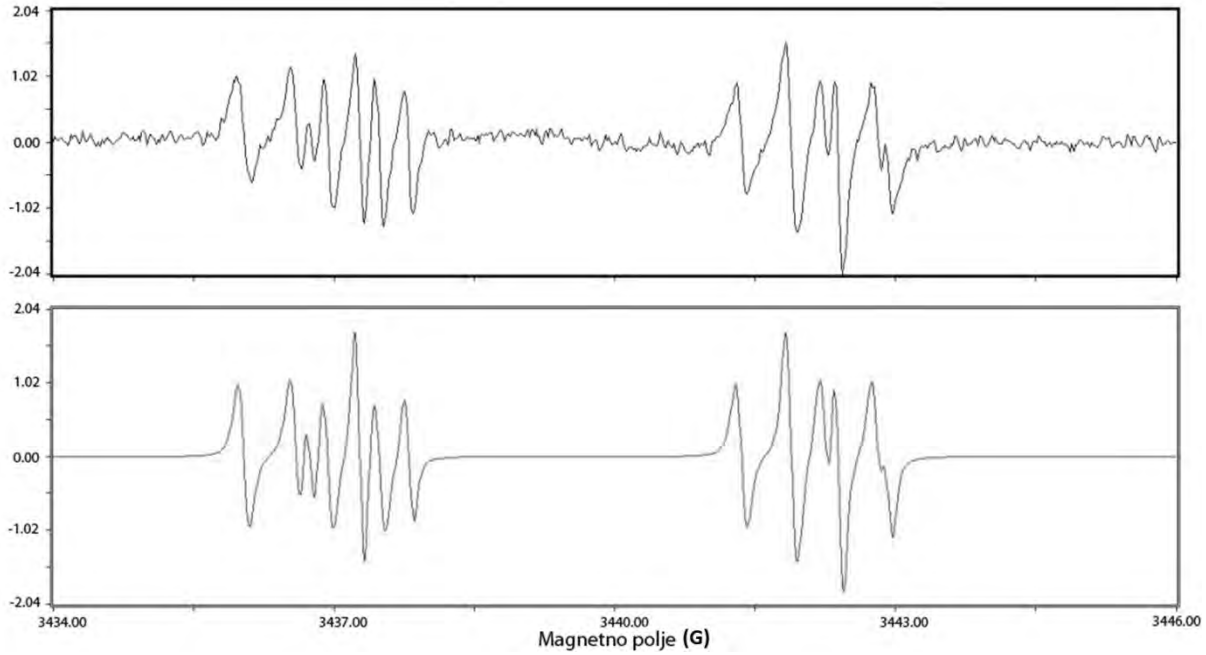


Slika 4.22. Slobodni radikali pirogalola dobijeni pri različitim pH vrednostima i njihovi odgovarajući ESR spektri [Carrington & Smith, 1964; Smith & Carrington, 1967].

U ovom radu metodom ESR nije detektovano formiranje slobodnih radikala u toku autooksidacije pirogalola u baznim vodenim rastvorima bez prisustva metalnih jona pri pH vrednostima manjim od 10. Primenom tehnike spinske stabilizacije [Kalyanaraman, 1990] ispitivan je proces autooksidacije pirogalola u slabo baznim vodenim rastvorima na sobnoj temperaturi u prisustvu Mg(II) jona. Ova tehnika je prvi put primenjena kod proučavanja kompleksiranja dijamagnetnih metalnih jona sa *orto*-benzosemihinonskim anjon radikalom [Eaton, 1964] i posebno je pogodna za proučavanje orto-benzosemihinonskih radikala zbog

toga što omogućava njihovu detekciju i karakterizaciju u neutralnim i čak slabo kiselim vodenim rastvorima. Tehnika spinske stabilizacije je dosta korišćena za ESR studije redoks reakcija mnogih biološki aktivnih jedinjenja koja imaju u sebi kateholnu strukturu, kao što su kateholamini [Kalyanaraman, 1990] i flavonoidi [van Acker *et al.*, 1996], ali je retko primenjivana za jedinjenja koja imaju pirogalolsku strukuru [Bors *et al.*, 2000; Nikolić G.M. *et al.*, 1998b; Perron *et al.*, 2011].

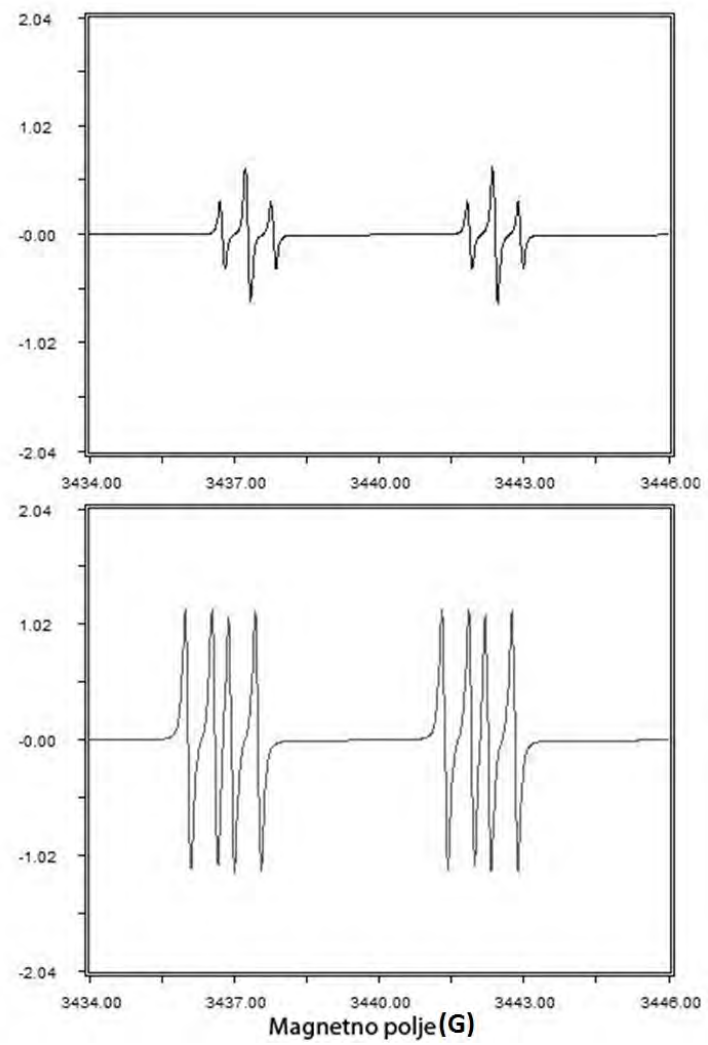
Na slici 4.23. prikazani su eksperimentalni ESR spektar pirogalola (c = 0,3 mmol/dm^3) snimljen 20 minuta nakon mešanja rastvora pirogalola sa Tris puferom (pH 8,5) koji sadrži Mg(II) jone i njegova kompjuterska simulacija. Asimetrični izgled ESR spektra prikazanog na slici 4.23, jasno ukazuje da u početnoj fazi autooksidacije pirogalola u prisustvu Mg(II) jona na pH od 8,5 nastaje više od jedne vrste slobodnog radikala. Zadovoljavajuća kompjuterska simulacija eksperimentalnog ESR spektra dobijena je korišćenjem pretpostavke da postoje dve slobodnoradikalske vrste u rastvoru.



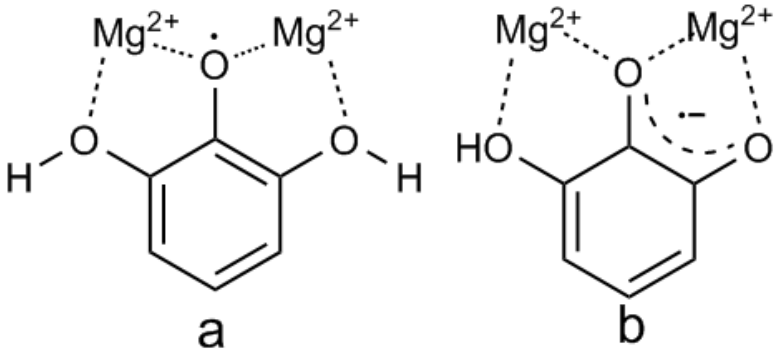
Slika 4.23. Eksperimentalni ESR spektar pirogalola na pH 8,5 u vodenom rastvoru u prisustvu Mg(II) jona (gore), kompjuterski simuliran spektar (dole).

Individualne komponente kompjuterski simuliranog ESR spektra prikazanog na slici 4.24. odgovaraju jednom slobodnom radikalu sa dva ekvivalentna i jednim neekvivalentnim protonom (dva tripleta sa odnosom inteziteta signala 1 : 2 : 1) i jednom slobodnom radikalu sa tri neekvivalentna protona (dva kvarteta sa odnosom inteziteta signala 1 : 1 : 1 : 1). Prvi radikal je najverovatnije osnovni radikal pirogalola nastao homolitičkim raskidanjem veze

kiseonik-vodonik jedne hidroksilne grupe, jer se pri ovoj pH vrednosti ne može očekivati disocijacija više od jedne hidroksilne grupe imajući u vidu da pKa pirogalola iznosi 8,94 [Kim *et al.*, 2001]. Uticaj vodonikovih atoma iz nedisosovanih hidroksilnih grupa na hiperfino cepanje, eliminisan je vezivanjem Mg(II) jona što ih čini lako odlazećim pa se ne mogu registrovati u ESR spektru. Drugi radikal je najverovatnije semihinonski radikal nastao tokom autooksidacije. I u ovom slučaju vezani Mg(II) joni sprečavaju formiranje vodoničnih veza što se manifestuje u ESR spektru odsustvom hiperfinog cepanja od strane vodonikovog atoma hidroksilne grupe. Predoložena struktura spinski stabilisanih radikala predstavljena je na slici 4.25.



Slika 4.24. Individualne komponente kompjuterski simuliranog ESR spektra: komponenta a (gore), b (dole).

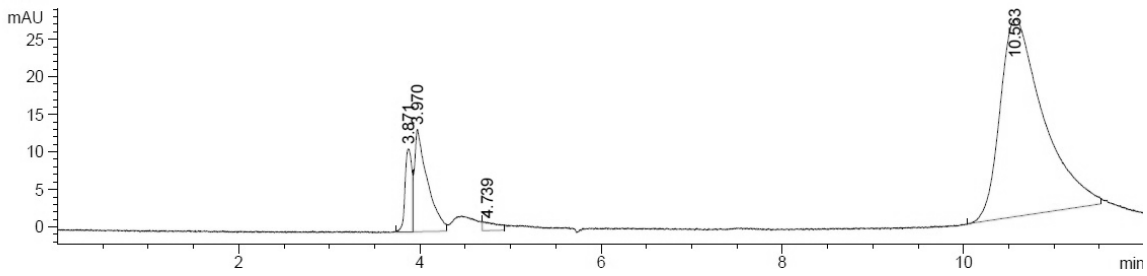


Slika 4.25. Predložene strukture primarnog (a) i sekundarnog (b) slobodnog radikala koji se formiraju tokom autooksidacije pirogalola u vodenim rastvorima na pH 8,5 u prisustvu Mg(II) jona.

Smanjenje vrednosti konstanti hiperfinog cepanja koje potiču od vodonikovih atoma benzenovog prstena kod spinski stabilisanog primarnog radikala (a(1H) = 5,12 G i a(2H) = 0,53 G) u odnosu na vrednosti za slobodan radikal u vodenom rastvoru (a(1H) = 5,66 G i a(2H) = 0,99 G, [Carrington & Smith, 1964]) ukazuje na smanjenje ukupne elektronske gustine na benzenovom prstenu kod spinski stabilisanog primarnog radikala usled uticaja Mg(II) jona. Ove promene slične su promenama kod Mg(II) spinski stabilisanog *orto*-benzosemihinonskog radikala [Eaton, 1964]. Povećanje *g*-vrednostti sekundarnog radikala u odnosu na primarni radikal, koje se vidi iz pomeranja signala u ESR spektru ka nižim vrednostima jačine magnetnog polja, takođe ukazuje da je kod ovog radikala povećana lokalizacija spina nesparenog elektrona na težim, kiseonikovim, atomima.

4.1.2.3. HPLC-DAD i HPLC-FL analiza

Slika 4.26. prikazuje hromatogram vodenog rastvora pirogalola na pH 7,4 u prisustvu Mg(II) jona nakon vremena autooksidacije od 15 min.



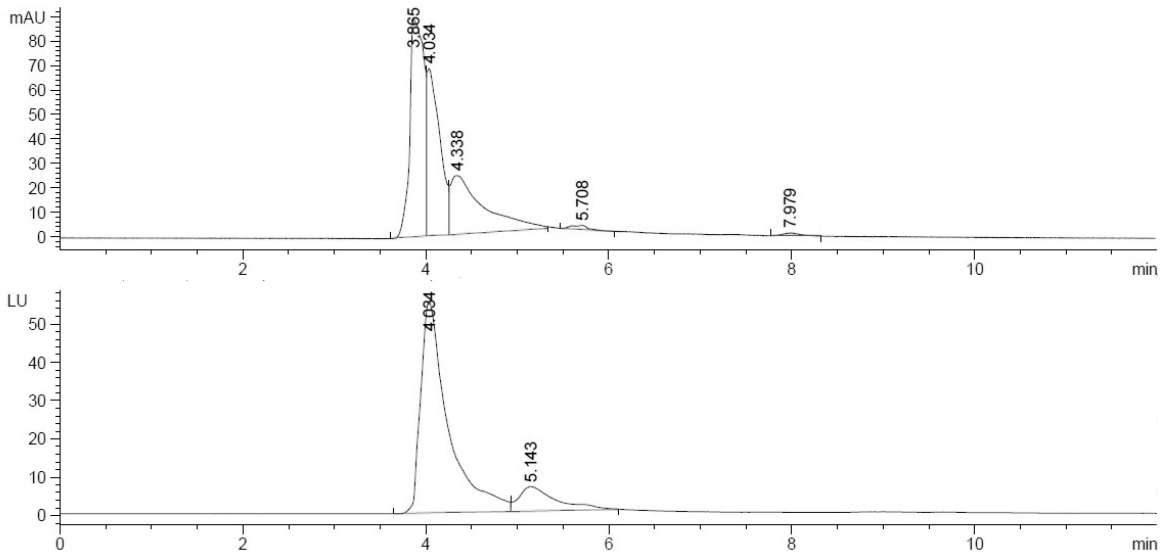
Slika 4.26. HPLC-DAD hromatogram proizvoda autooksidacije pirogalola na pH 7,4 u prisustvu Mg(II) jona nakon 15 minuta od početka reakcije autooksidacije (detekciona talasna dužina 350 nm).

Hromatogram sa slike 4.26. pokazuje tri izražena pika sa retencionim vremenima (RT) od 3,871; 3,970 i 10,653 minuta. Javlja se i veoma slabo izraženi pik sa RT od 4,739 min. Pik sa RT od 10,563 min odgovara pirogalolu, dok jedinjenja sa RT od 3,871 i 3,970 min predstavljaju proizvode autooksidacije. Prema predloženom mehanizmu autooksidacija pirogalola u prisustvu Mg(II) jona ide preko purpurogalina koji podleže daljoj transformaciji tako da prisustvo dva, po hemijskim karakteristikama bliska jedinjenja, ide u prilog navedenom mehanizmu autooksidacije.

Slika 4.27. prikazuje hromatogram vodenog rastvora pirogalola na pH 7,4 u prisustvu Mg(II) jona nakon vremena autooksidacije od 24 časa.

Hromatogram prikazan na slici 4.27. (gore) ukazuje da je pirogalol u potpunosti izreagovao jer se hromatografski pik na RT od 10,563 min izgubio. U HPLC-DAD hormatogramu javljaju se dva intezivna, veoma bliska pika na RT od 3,856 i 4,034 min i jedan manje intezivan pik na RT od 4.338 min. Pored navedena tri javljaju se još dva veoma slabo izražena pika na RT od 5,708 i 7,979. U HPLC-FL hromatogramu javljaju se dva izražena pika na RT od 4,034 (pik jakog inteziteta koji se javlja i u HPLC-DAD hromatogramu) i 5,143 (pik slabog inteziteta).

Kako su vrednosti za RT proizvoda autooksidacije u oba hromatograma manja od vrednosti za pirogalol može se pretpostaviti da se radi o jedinjenjima veće polarnosti jer je hromatografija rađena u sistemu reverznih faza.



Slika 4.27. HPLC hromatogrami proizvoda autooksidacije pirogalola nakon 24 h na pH 7,4 u prisustvu Mg(II) jona: gore) DAD detektor - detekciona talasna dužina 350 nm, dole) FL detektor - ekscitaciona talasna dužina 250 nm, a emisiona 450 nm.

4.1.3. Autooksidacija pirogalola u prisustvu Zn(II) jona

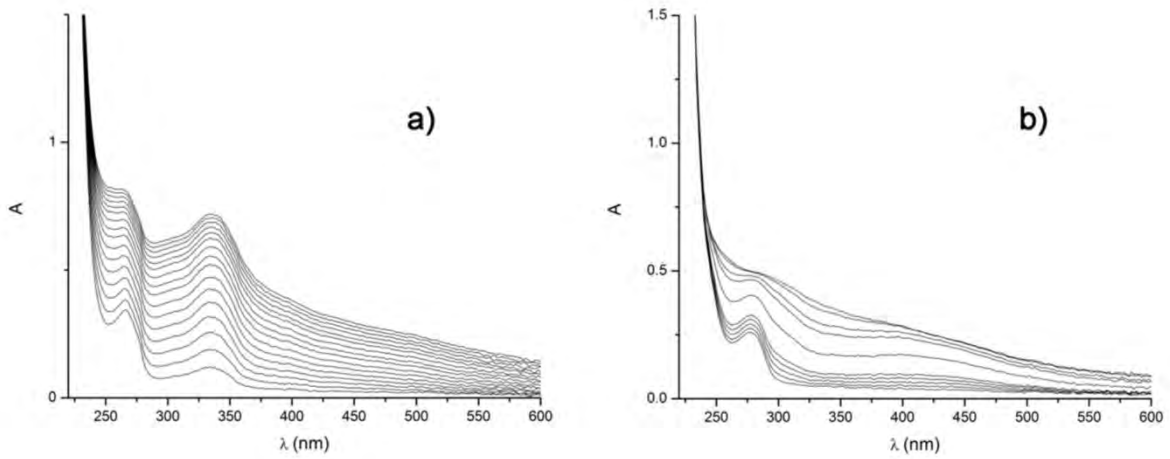
4.1.3.1. UV/Vis spektralna analiza

Na slici 4.28. su prikazani UV/Vis spektri snimljeni tokom autooksidacije pirogalola u vodenom rastvoru na pH 5,5 i 6,5 u prisustvu Zn(II) jona. Različiti spektralni profili koji se mogu uočiti u ova dva slučaja potvrđuju zavisnost autooksidacije pirogalola od prisustva Zn(II) jona i pH vodenog rastvora. Vizuelno poređenje spektara dobijenih prilikom autooksidacije na pH 5,5 pokazuje da se proces odvija na veoma sličan način kao početna faza procesa autooksidacije pirogalola na pH 7,4 bez prisustva metalnih jona. Spektri snimljni tokom autooksidacije pirogalola na pH 6,5 u prisustvu Zn(II) jona ukazuju na mogućnost postojanja drugačijeg mehanizma autooksidacije.

Analiza snimljenih UV/Vis spektara pokazuje kontinualno povećanje apsorbancije u opsegu od 220 do 600 nm. Uočava se takođe pojava slabo izraženog maksimuma na oko 410 nm. Ne uočava se ni jedna izobestička tačka.

Grafička analiza matričnom metodom pokazala je da se u oba autooksidaciona procesa javljaju dve apsorbujuće čestice u ravnoteži.

Radi dalje analize procesa primenjena je MCR-ALS metoda. Prvi korak bilo je konstruisanje matrica ***D*** po principima definisanim u Poglavlju 2.4.1.2. Sledeći korak bio je određivanje jedinstvenih vrednosti primenom SVD. Tabela 4.4. prikazuje jedinstvene vrednosti dobijene primenom SVD za autooksidacione procese na obe pH vrednosti. Podaci za jedinstvene vrednosti za navedene procese pokazuju da proces prati jednostavan mehanizam sa dve apsorbujuće čestice. Iz tog razloga su u matricama $\boldsymbol{D}_{PG\text{-}Zn\text{-}5.5}$, $\boldsymbol{D}_{PG\text{-}Zn\text{-}6.5}$ značajne dve svojstvene vrednosti.



Slika 4.28. UV/Vis spektri snimljeni u toku procesa autooksidacije pirogalola u prisustvu Zn(II) jona (koncentracija pirogalola = 300 μmol/dm^3, interval snimanja na 5 minuta) a) pH 5,5; b) pH 6,5.

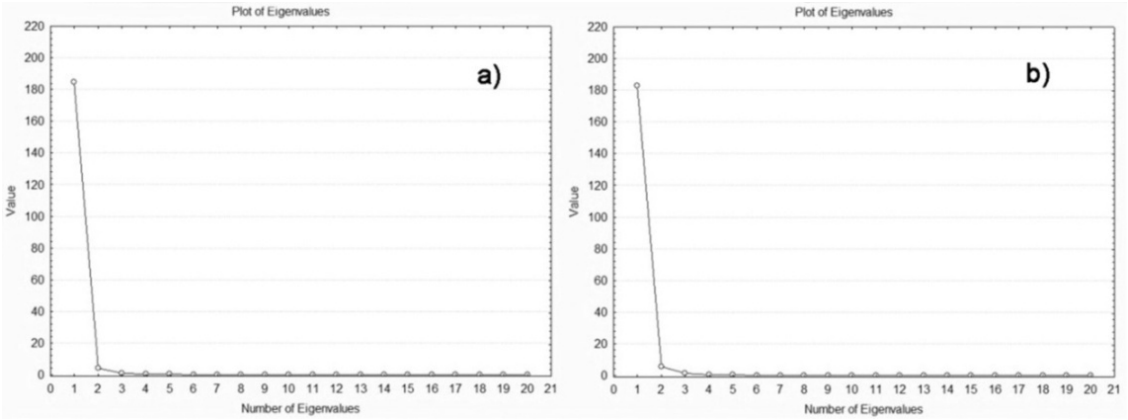
Tabela 4.4. Analiza ranga matrica $\boldsymbol{D}_{PG\text{-}Zn\text{-}5.6}$, $\boldsymbol{D}_{PG\text{-}Zn\text{-}6.5}$ (prikazano je prvih pet jedinstvenih vrednosti).

Faktori	pH 5,5	pH 6,5
1	32,2334	25,9414
2	5,29112	3,42239
3	0,505954	0,38108
4	0,30671	0,303772
5	0,166221	0,184692

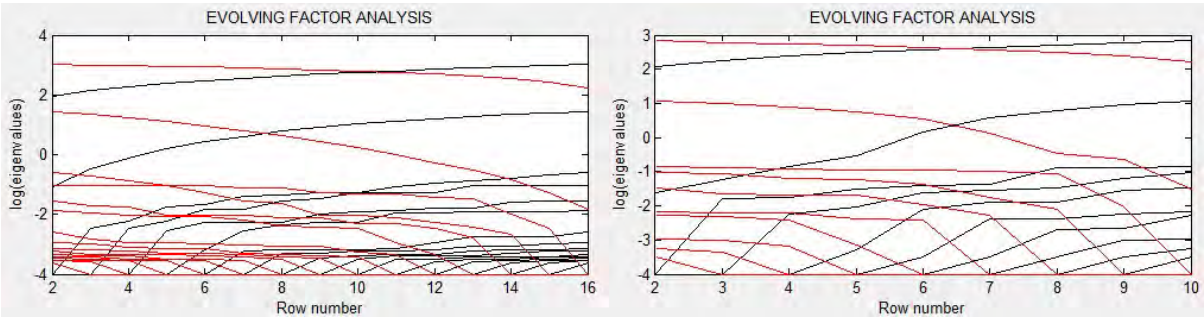
Za procenu ranga matrica apsorbancija primenjen je *scree* grafički prikaz u faktorskoj analizi (FA). Slika 4.29. prikazuje *scree* grafički prikaz za FA procesa autooksidacije pirogalola na pH vrednostima 5,5 i 6,5 u prisustvu Zn(II) jona. Rezultati prikazani na slici 4.29. pokazuju da je za navedene procese autooksidacije rang matrica apsorpcija dva. U skladu sa dobijenim rezultatima broj svojstvenih vrednosti je dva za oba procesa.

Slika 4.30. prikazuje EFA grafički prikaz za procese autooksidacije pirogalola na pH 5.5 i 6.5 u prisustvu Zn(II) jona. Analiza unapred podataka za sve procese pokazuje da se promene spektralnih podataka od samog početka autooksidacije mogu objasniti preko dva faktora. Prisustvo dva faktora od samog početka reakcije može se povezati sa prisustvom dve apsorbujuće čestice u procesu autooksidacije pirogalola. Iste informacije se dobijaju i pomoću EFA analize unazad matrica $\boldsymbol{D}_{PG\text{-}Zn\text{-}5.5}$, $\boldsymbol{D}_{PG\text{-}Zn\text{-}6.5}$.

Rezultati dobijeni iz *scree* grafičkog prikaza (svojstvene vrednosti) u FA i EFA grafičkog prikaza su identični (*log of eigenvalues* korišćen u ALS) i iznose dva. Detaljnije informacije o jedinjenjima koja su uključena u proces autooksidacije se mogu dobiti primenom MCR-ALS analize matrica $\boldsymbol{D}_{PG\text{-}Zn\text{-}5.5}$, $\boldsymbol{D}_{PG\text{-}Zn\text{-}6.5}$.



Slika 4.29. *Scree* grafički prikaz u faktorskoj analizi (FA) za proces autooksidacije pirogalola na pH a) 5,5 i b) 6,5 u prisustvu Zn(II) jona.



Slika 4.30. EFA grafički prikaz matrica spektralnih podaka ($\boldsymbol{D}_{PirZn\text{-}5.5}$ levo, $\boldsymbol{D}_{PirZn\text{-}6.5}$ desno). Pravci analize: unapred (crne linije) i unazad (crvene linije).

Eksperimentalni podaci su obrađeni korišćenjem *soft* MCR-ALS metode uz primenu uslova ne-negativnosti (za koncentraciju i spektre) i jednoznačnost (za koncentracione profile). Primena MCR-ALS metode je ukazala na postojanje dve apsorbujuće čestice za

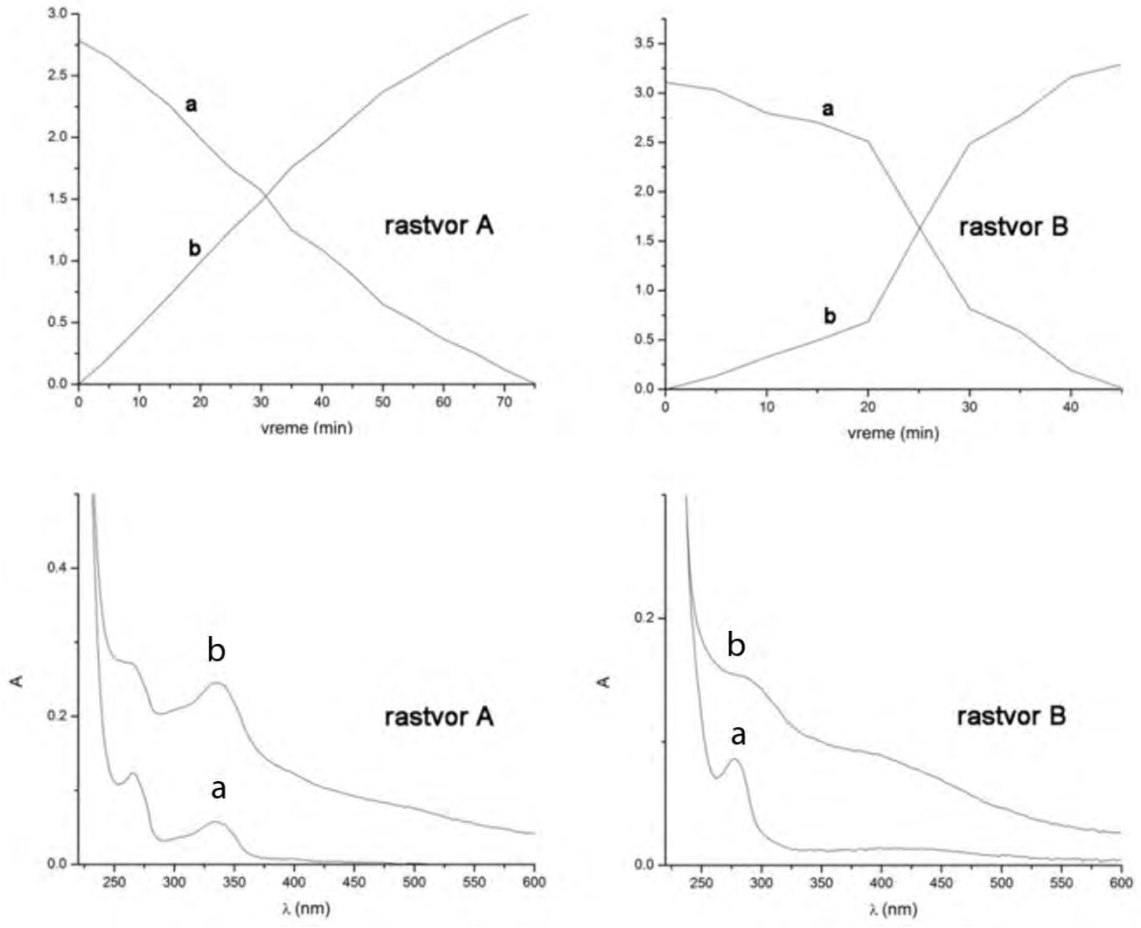
autooksidacione procese na navedenim pH vredostima. Procenat LOF% za sva oba procesa je bio niži od 1%. Tabela 4.5. prikazuje procenu kvaliteta razdvajanja korišćenjem standardne devijacije ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke, greške fitovanja i objašnjene variance.

Tabela 4.5. Kvalitet rezolucije procenjen korišćenjem standardne devijacije ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke, LOF% i objašnjene variance.

	pH 5,5	pH 6,5
SdRex	0,011476	0,012237
LOF% (PCA)	0,1924	$1{,}2886\times10^{-6}$
LOF% (exp)	1,9418	2,0434
r^2	99,9623	99,9582

SdRex - standardna devijacija ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke
LOF% – *lack-of-fit* za PCA i eksperiment
r^2 – procenat objašnjene varijance

Slika 4.31. prikazuje koncentracione profile (***C***) dobijene primenom MCR-ALS metode i odgovarajuće spektre ($\boldsymbol{S}^{\mathbf{T}}$) čistih komponenti za oba procesa.



Slika 4.31. Spektri čistih komponenti ($\boldsymbol{S}^{T}$) i koncentracioni profili ($\boldsymbol{C}$) dobijeni MCR-ALS metodom za proces autooksidacije pirogalola: rastvor A (pH 5,5; C(Zn(II)) = 0,1 mol dm^{-3}; a) pirogalol, b) purpurogalin) i rastvor B (pH 6,5; C(Zn(II)) = 0,1 mol dm^{-3} ; a) pirogalol, b) proizvod autooksidacije).

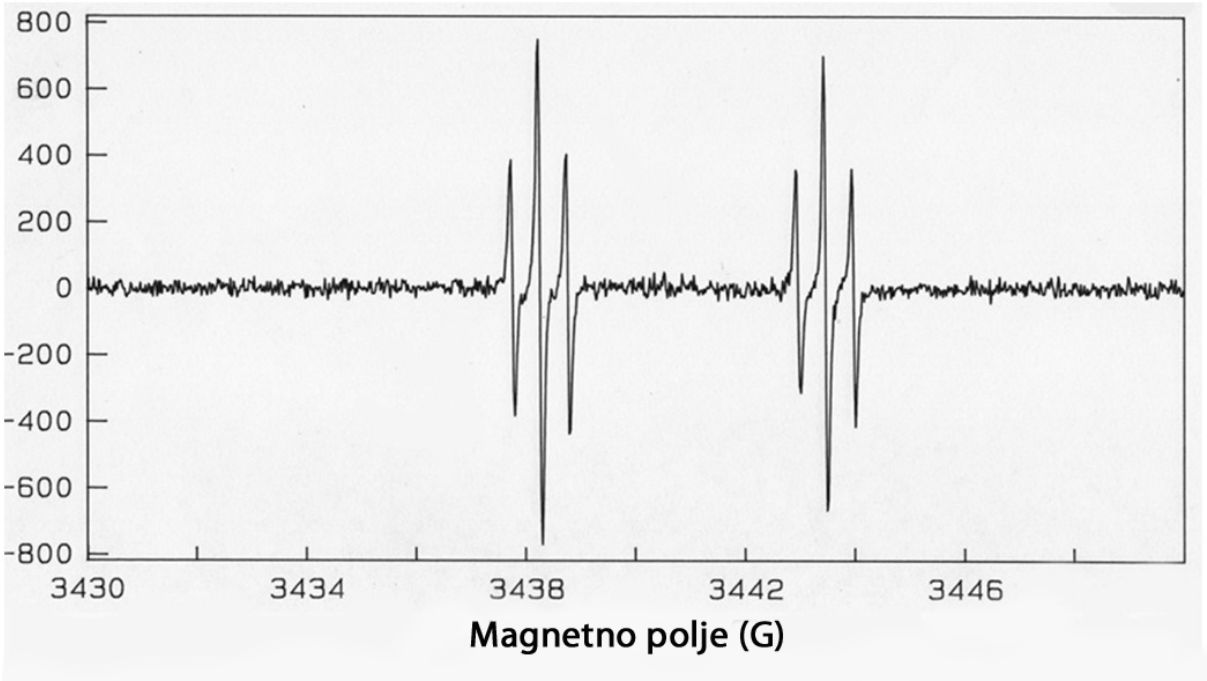
U rastvoru A detektovan je jedan autooksidacioni proizvod. UV/Vis spektar dobijen primenom MCR-ALS metode za supstancu b) iz rastvora A sa slike 4.31. pokazuje sličnost sa spektrima purpurogalina koji su prikazani u literaturi [Miyazaki *et al.*, 2004; Tauber, 1953]. Purpurogalin ima dva UV apsorpciona maksimuma oko 270 i 320 nm i maksimum u vidljivom delu spektra na oko 425 nm. MCR-ALS metodom dobijeni su koncentracioni profili za sva jedinjenja u procesu autooksidacije pirogalola u prisustvu Zn(II) jona na pH 5,5 i 6,5. U vremenskom intervalu praćenja procesa dolazi do konstantnog opadanja koncentracije pirogalola (jedinjenje a) i povećanje koncentracije proizvoda autooksidacije (najverovatnije purpurogalina, supstanca b). Dobijeni koncentracioni profili prikazani na slici 4.31. za rastvor A ukazuju da proces autooksidacije pirogalola na pH 5,5 u prisustvu Zn(II) jona prati jednostavanu kinetiku prvog reda. Ponašanje pirogalola u prisustvu Zn(II) jona

može se objasniti vezivanjem jona cinka za hidroksilne grupe pirogalola, čime se onemogućava građenje intramolekulskih vodoničnih veza. To povećava kiselost hidroksilnih grupa i samim tim olakšava autooksidaciju na nižim pH vrednostima.

Na pH 6,5 je takođe utvrđeno prisustvo jednog autooksidacionog proizvoda. Dobijeni koncentracioni profili za navedeni proces takođe ukazuju da reakcija prati kinetiku prvog reda. Spektar autooksidacionog proizvoda dobijen MACR-ALS metodom se značajno razlikuje u odnosu na dobijei spektar proizvoda autooksidacije na pH 5.5 u prisustvu Zn(II) jona. Dobijeni spektar proizvoda autooksidacije pirogalola na pH 6.5 u prisustvu Zn(II) jona ne pokazuje izažene maksimume pa se može pretpostaviti da se kod njega javlja izražena delokalizacija π elektrona. Ovaj spektar je sličan spektrima huminskih kiselina [Veselinović *et. al.*, 2010] što ukazuje na mogućnost polimerizacije pirogalola kao reakcioni mehanizam autooksidacije pri ovim uslovima.

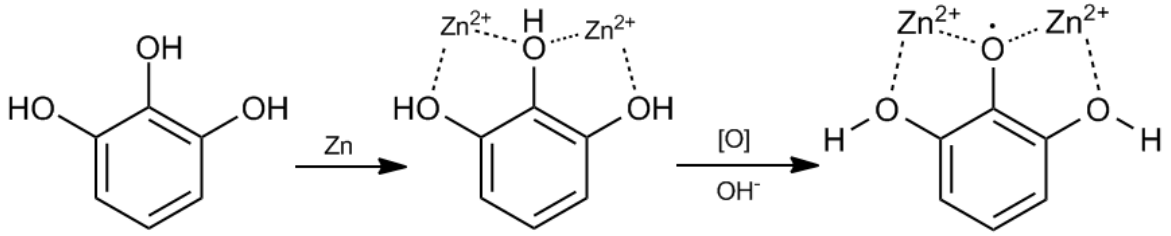
4.1.3.2. ESR analiza

Na slici 4.32. je prikazan ESR spektar snimljen 20 minuta nakon mešanja rastvora pirogalola u acetatnom puferu koji sadrži Zn(II) jone (pH 6,5; C(Zn(II)) = 0,2 mol dm^{-3}).



Slika 4.32. Eksperimentalni ESR spektar pirogalola na pH 6,5 u vodenom rastvoru u prisustvu Zn(II) jona.

ESR spektar prikazan na slici 4.32 odgovara jednom slobodnom radikalu u kome postoji interakcija nesparenog elektrona sa dva ekvivalentna i jednim nekvivalentnim protonom (dva tripleta sa odnosom inteziteta signala 1 : 2 : 1). Ovakav spektar odgovara strukturi spinski stabilisanog radikala čije je nastajanje prikazano na šemi 4.5.



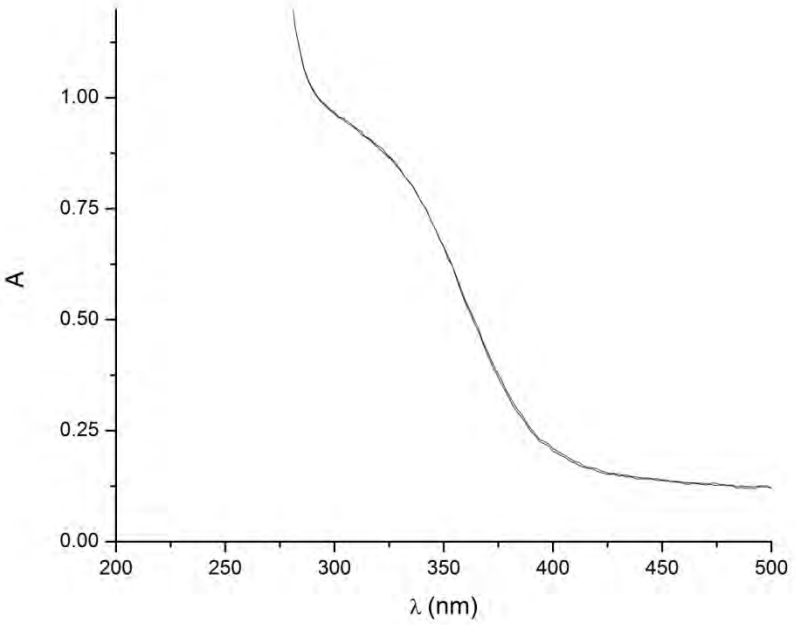
Šema 4.5. Reakcija vezivanja Zn(II) jona za pirogalol i građenje spinski stabilisanog radikala.

Konstante hiperfinog cepanja za protone na benzenovom prstenu kod spinski stabilisanog radikala (a(1H) = 5,18 G i a(2H) = 0,51 G) su znatno manje u odnosu na slobodni radikal pirogalola u vodenom rastvoru (a(1H) = 5,66 G i a(2H) = 0,99 G; [Carrington & Smith, 1964]) što je direktna posledica smanjenja elektronske gustine na benzenovom prstenu uzrokovane interakcijom sa Zn(II) jonima. Ova promena vrednosti konstanti hiperfinog cepanja slična je promeni odgovarajućih konstanti kod *orto*-benzosemihinonskog radikala u prisustvu Zn(II) jona [Eaton, 1964].

4.1.4. Autooksidacija pirogalola u prisustvu Pb(II) i Cd(II) jona

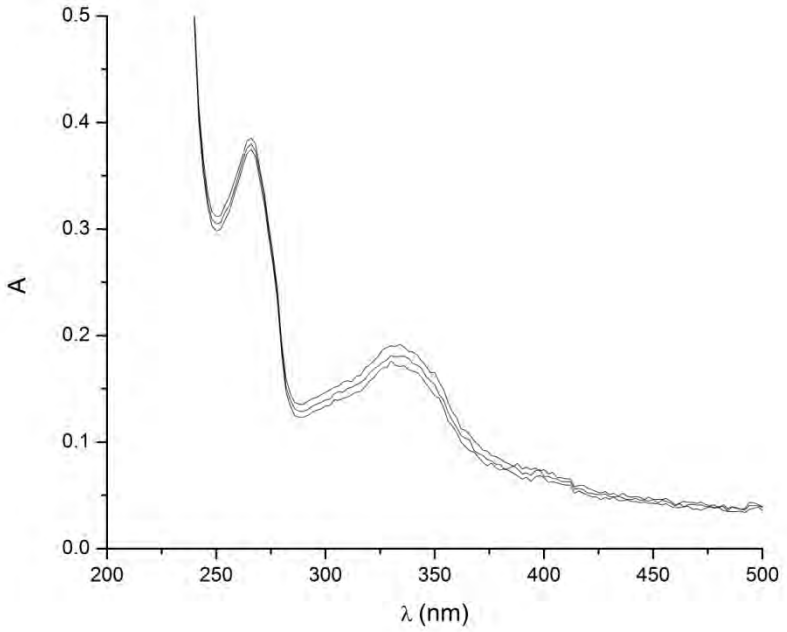
4.1.4.1. UV/Vis spektralna analiza

Proces autooksidacije pirogalola u vodenom rastvoru u prisustvu Pb(II) i Cd(II) jona (C = 0,1 mol dm^{-3}) praćen je spektrofotometrijski na pH 5,5 u vremenskom intervalu do 2 dana. Pri navedenim uslovima nije došlo do izraženih promena u UV/Vis spektrima ispitivanih sistema sa vremenom što je prikazano na slikama 4.33. i 4.34. i to ukazuje da prisustvo ovih jona u rastvoru ne favorizuje proces autooksidacije pirogalola u slabo kiseloj sredini.



Slika 4.33. UV/Vis spektri snimljeni u toku procesa autooksidacije pirogalola u vodenom rastvoru u prisustvu Pb(II) jona (C(PG) = 300 μmol dm^{-3}, vremenski interval snimanja 5 h, pH 5,5; c(Pb(II)) = 0,1 mol dm^{-3}).

UV/Vis spektar pirogalola u prisustvu Pb(II) jona se veoma razlikuje od UV/Vis spektra pirogalola u vodenom rastvoru u odsustvu M(II) jona, ali se sa vremenom praktično ne menja. Ovo se može objasniti značajno različitim fizičkohemijskim karakteristikama Pb(II) jona u odnosu na druge M(II) jone ispitivane u ovom radu (veliki jonski radijus uz relativno veliku elektronegativnost) što omogućava građenje stabilnog kompleksa sa pirogalolom (uz verovatno značajno učešće kovalentne veze) koji pod navedenim uslovima ne podleže autooksidaciji.



Slika 4.34. UV/Vis spektri snimljeni u toku procesa autooksidacije pirogalola u vodenom rastvoru u prisustvu Cd(II) jona (C(PG) = 300 μmol dm^{-3}, vremenski interval snimanja 12 h, pH 5,5; c(Cd(II)) = 0,1 mol dm^{-3}).

Prikazani UV/Vis spektri su veoma slični UV/Vis spektrima pirogalola u prisustvu Zn(II) jona u početnoj fazi autooksidacije pod istim uslovima. Veoma male promene u UV/Vis spektrima sa vremenom ukazuju da prisustvo Cd(II) jona ne favorizuje autooksidaciju pirogalola u vodenom rastvoru pri navedenim uslovima za razliku od Zn(II) jona koji ima sličnu elektronegativnost ali značajno manji jonski radijus. I u ovom slučaju se može pretpostaviti da dolazi do građenja neke vrste stabilnog kompleksa koji ne podleže autooksidaciji u slabo kiseloj sredini ali sa manjim učešćem kovalentne veze nego u slučaju Pb(II) jona.

Ovi rezultati mogu da se dovedu u vezu sa mogućnošću akumulacije Pb(II) i Cd(II) jona u organskim sedimentima sa visokim sadržajem huminskih kiselina što je od velikog ekološkog značaja [Kinniburgh *et al.,* 1999].

4.2. Galna kiselina

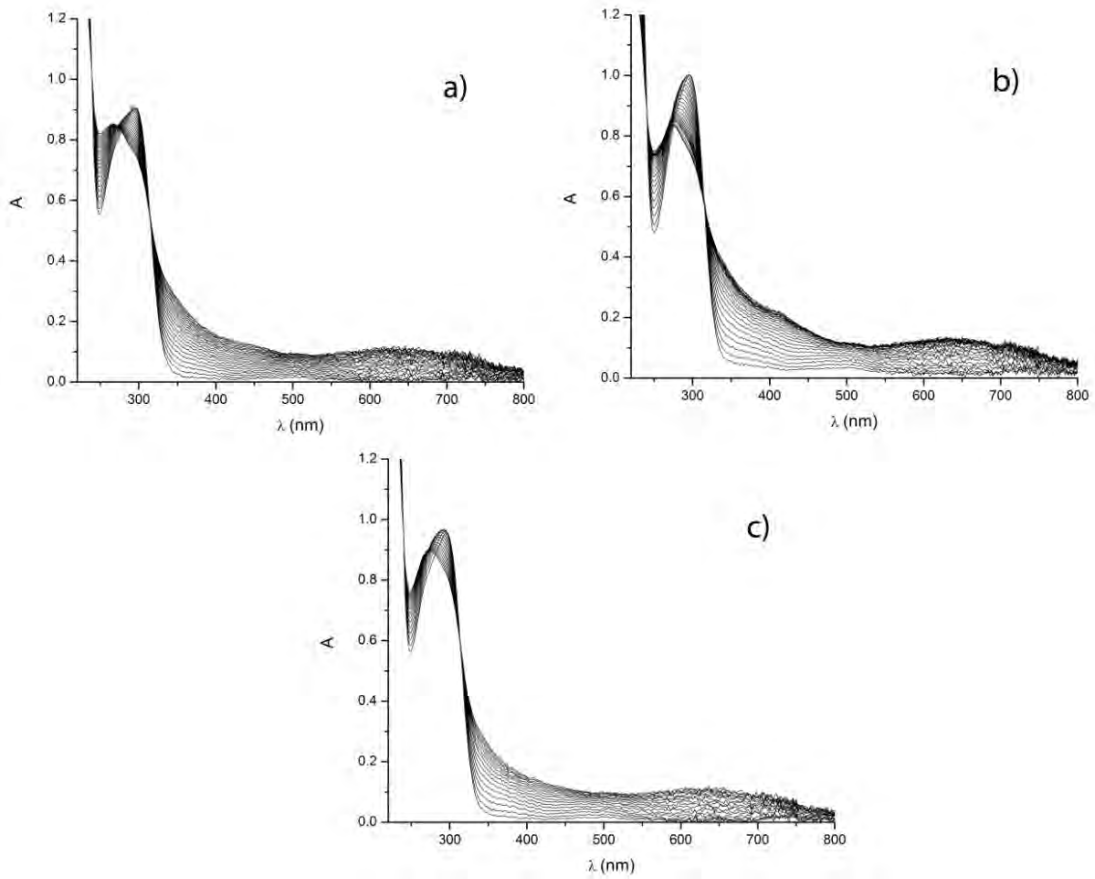
4.2.1. Autooksidacija galne kiseline u baznim vodenim rastvorima

4.2.1.1. UV/Vis spektralna analiza

Na slici 4.35. su prikazani UV/Vis spektri snimljeni u toku procesa autooksidacije galne kiseline (GA) u vodenom rastvoru na pH: a) 9,5; b) 10,0 i c) 10,5. Različiti spektralni profili koji se mogu uočiti u ova tri slučaja potvrđuju zavisnost autooksidacije galne kiseline od pH vrednosti sredine. Razlika se ogleda pre svega u brzini procesa, dok su izgled spektara, kao i spektralne promene veoma slični za sve autooksidacione procese na navedenim pH vrednostima.

Uočava se povećanje aposorbance za sva tri procesa u opsegu od 350-800 nm uz pojavu apsorpcionog maksimuma na oko 630 nm. Intenzitet apsorpcionog maksimuma galne kiseline na oko 300 nm se smanjuje i dolazi do hipsohromnog pomeranja na 275 nm. Takođe se uočava pojava dve jasno definisane izobestičke tačke na 240 nm i 315 nm, dok izobestička tačka na oko 270 nm nije jasno definisana.

Grafička analiza spektralnih podataka matričnom metodom pokazala je da se kod autooksidacionih procesa galne kiseline na pH vrednostima od 9,5, 10,0 i 10,5 javljaju dve čestice u ravnoteži.



Slika 4.35. UV/Vis spektri snimljenu u toku procesa autooksidacije GA (C(GA) = 300 μmol dm^{-3}, vremenski interval snimanja 1 minut) na: a) pH 9,5; b) pH 10,0 i c) pH 10,5.

Radi dalje analize procesa primenjena je MCR-ALS metoda. Prvi korak bilo je konstruisanje matrica ***D*** po principima definisanim u Poglavlju 2.4.1.2. Sledeći korak bio je određivanje jedinstvenih vrednosti primenom SVD. Tabela 4.6. prikazuje jedinstvene vrednosti dobijene primenom SVD za autooksidacione procese na pH vredonstima od 9,5; 10,0 i 10,5. Podaci za jedinstvene vrednosti za navedene procese pokazuju da proces prati jednostavan mehanizam sa dve apsorbujuće čestice, jer su dve jedinstvene vrednosti značajne u matricama $\boldsymbol{D_{GA9.5}}$, $\boldsymbol{D_{GA10.0}}$ i $\boldsymbol{D_{GA10.5}}$.

Tabela 4.6. Rang analiza matrica $\boldsymbol{D_{GA9.5}}$, $\boldsymbol{D_{GA10.0}}$ i $\boldsymbol{D_{GA10.5}}$ (prikazano je prvih pet jedinstvenih vredosti).

Faktori	pH 9,5	pH 10,0	pH 10.5
1	39,4357	34,4134	29,6728
2	5,61972	4,59572	2,86335
3	0,400234	0,338668	0,26
4	0,178512	0,119561	0,0751004
5	0,08088	0,07555	0,068086

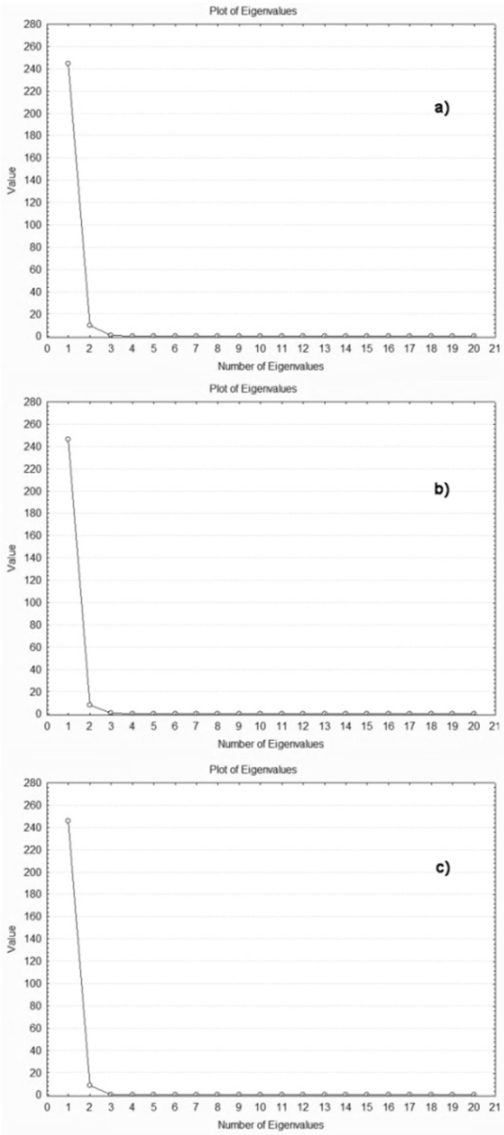
Za procenu ranga matrica apsorbancija primenjen je *scree* grafički prikaz u faktorskoj analizi (FA). Slika 4.36. prikazuje *scree* grafički prikaz za FA za proces autooksidacije galne kiseline u vodenom rastvoru na pH vredonstima 9,5; 10,0 i 10,5.

Rezultati prikazani na slici 4.36. pokazuju da je za procese autooksidacije galne kiseline na pH vredonstima 9,5; 10,0 i 10,5 rang matrica apsorbancija dva. U skladu sa dobijenim rezultatima broj jedinstvenih vrednosti je dva za sva tri procesa.

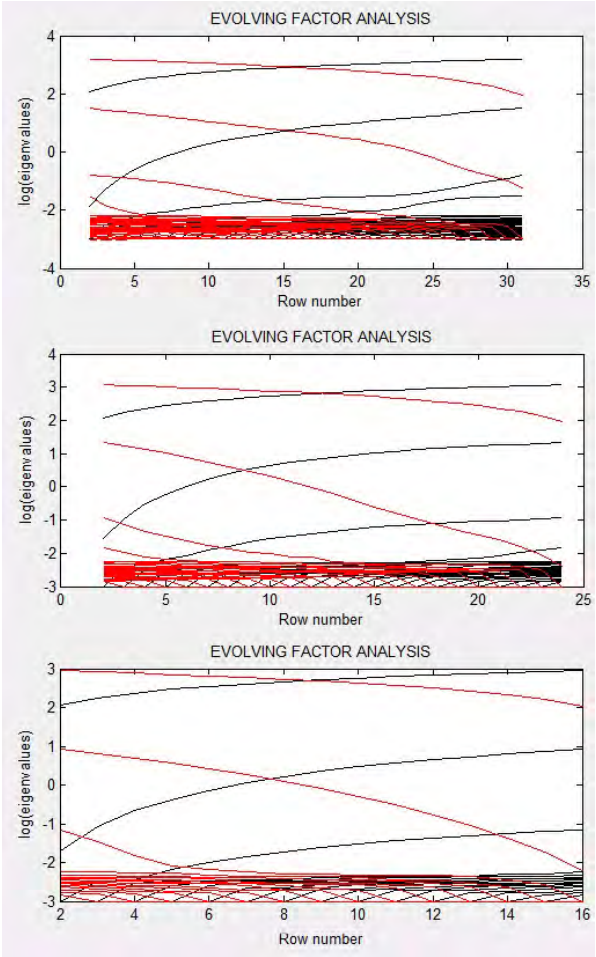
Slika 4.37. prikazuje EFA grafički prikaz za proces autooksidacije galne kiseline na pH vrednostima 9,5; 10,0 i 10,5. Analiza unapred podataka za sve procese pokazuje da se promene spektralnih podataka od samog početka procesa autooksidacije mogu objasniti preko dva faktora. Prisustvo dva faktora od samog početka reakcije može se povezati sa prisustvom dve apsorbujuće vrste u reakciji u kojoj dolazi do autooksidacije galne kiseline. Iste informacije se dobijaju i pomoću analize unazad matrica $\boldsymbol{D}_{GA9.5}$, $\boldsymbol{D}_{GA10.0}$ i $\boldsymbol{D}_{GA10.5}$.

Vrednosti dobijene iz *scree* grafičkog prikaza svojstvenih vrednosti u FA analizi i EFA grafičkog prikaza su identični (*log of eigenvalues* korišćen u ALS), i iznose dva. Dodatne informacije o jedinjenjima koja su uključena u proces autooksidacije galne kiseline na pH 9,5; 10,0 i 10,5 se mogu dobiti primenom MCR-ALS analize matrica $\boldsymbol{D}_{GA9.5}$, $\boldsymbol{D}_{GA10.0}$ i $\boldsymbol{D}_{GA10.5}$.

Eksperimentalni podaci su obrađeni korišćenjem *soft* MCR-ALS metode primenom uslova ne-negativnosti (za koncentraciju i spektre) i jednoznačnosti (za koncentracione profile). Primena MCR-ALS metode je izdvojila dve čestice za autooksidacione procese na navedenim pH vredostima. Procenat LOF% za sva tri procesa je bio niži od 1%. Tabela 4.7. prikazuje procenu kvaliteta razdvajanja korišćenem standardne devijacije ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke, greške fitovanja i objašnjene varijance.



Slika 4.36. *Scree* grafički prikaz faktorske analize (FA) za proces autooksidacije galne kiseline na pH a) 9,5, b) 10,0 i c) 10,5



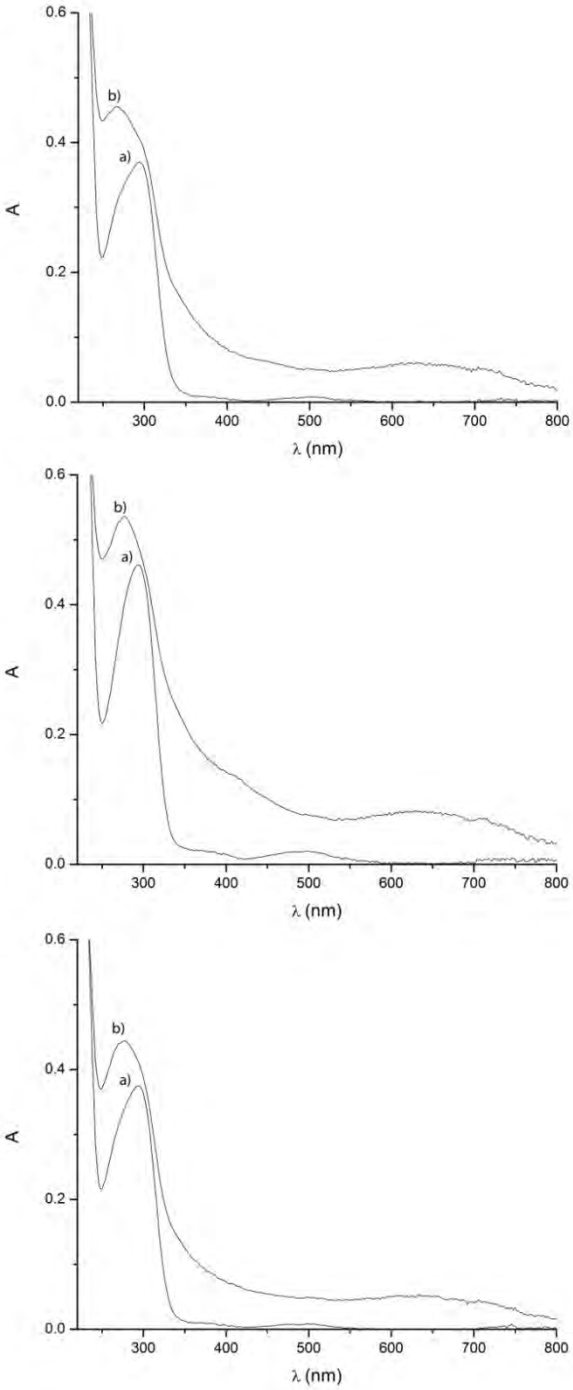
Slika 4.37. EFA grafički prikaz matrica spektralnih podaka ($\boldsymbol{D}_{GA9.5}$ gore, $\boldsymbol{D}_{GA10.0}$ sredina, $\boldsymbol{D}_{GA10.5}$ dole). Pravci analize: unapred (crne linije) i unazad (crvene linije).

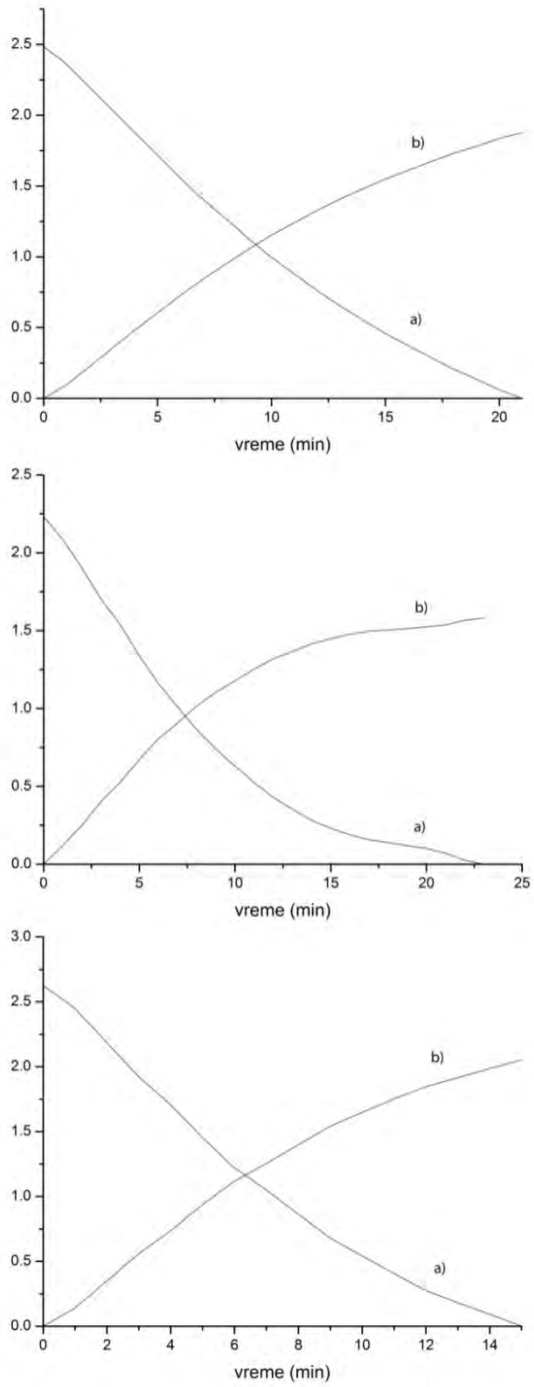
Tabela 4.7. Kvalitet razdvajanja komponenti procenjen korišćenjem standardne devijacije ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke, LOF% i objašnjene varijance.

	pH 9,5	pH 10,0	pH 10,5
SdRex	0,0055162	0,0052441	0,004903
LOF% (PCA)	0,04995	0,0010032	0,20627
LOF% (exp)	1,3151	1,2622	1,1222
r^2	99,9827	99,9841	99,9874

SdRex – standardna devijacija ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke
LOF% – *lack-of-fit* za PCA i eksperiment
r^2 – procenat objašnjene varijance

Slika 4.38. prikazuje odgovarajuće spektre pojedinačnih komponenti ($\boldsymbol{S}^{\mathbf{T}}$) za sva tri procesa, dok slika 4.39. prikazuje izračunate koncentracione profile (***C***) svih učestvujućih jedinjenja.

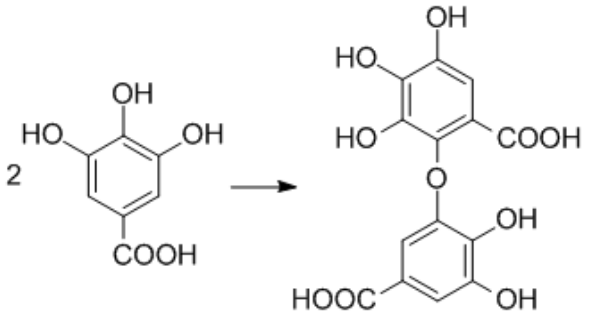




Slika 4.38. Spektri čistih komponenti ($\boldsymbol{S}^{\mathbf{T}}$) dobijeni primenom MCR-ALS metode: gore pH 9,5; sredina pH 10,0; dole pH 10,5; a) galna kiselina, b) proizvod autooksidacije

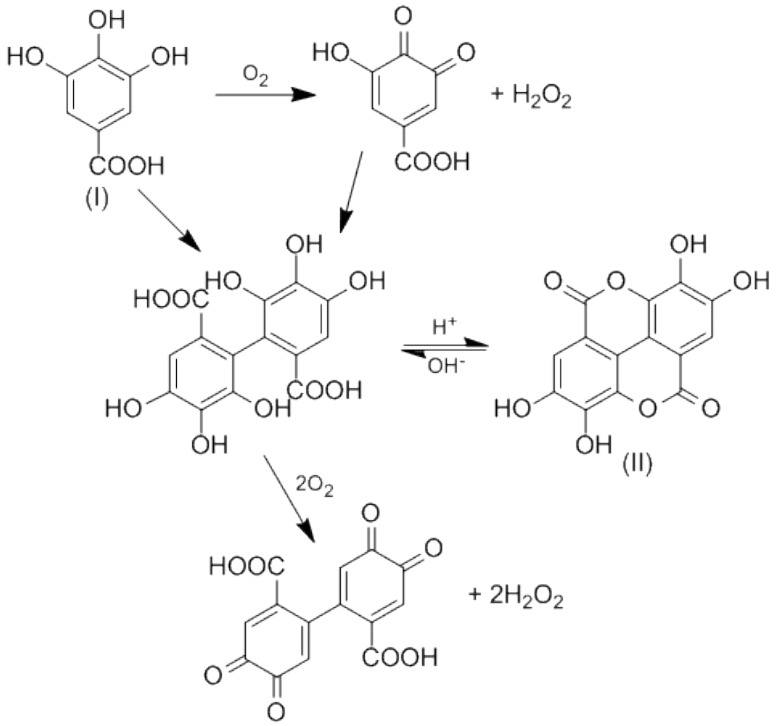
Slika 4.39. Kinetički profili (***C***) dobijeni primenom MCR-ALS metode: gore pH 9,5; sredina pH 10,0; dole pH 10,5; a) galna kiselina, b) proizvod autooksidacije

U svim procesima autooksidacije galne kiseline na pH vrednostima od 9,5, 10,0 i 10,5 detektovan je samo jedan autooksidacioni proizvod koji je identičan za sva tri procesa. Literaturni podaci pokazuju da pri oksidaciji ili autooksidaciji GA u baznoj sredini postoji mogućnost građenja C-C i C-O dimera [Oniki i Takahama, 2004; Friedman i Jurgens, 2000]. Građenje C-O dimera prikazano je u reakciji 4.3.



(4.3.)

Mogućnost građenja C-O dimera uočena je pri reakciji autooksidacije u jako baznoj sredini [Friedman i Jurgens, 2000]. Nagrađeni dimer može intramolekulskom esterifikacijom da pređe u elaginsku kiselinu ili da se dalje oksiduje u dimer hinonske strukture. Jedna od mogućih reakcija u procesu autooksidacije GA u jako baznoj sredini je i građenje odgovarajućeg hinona (šema 4.6.).

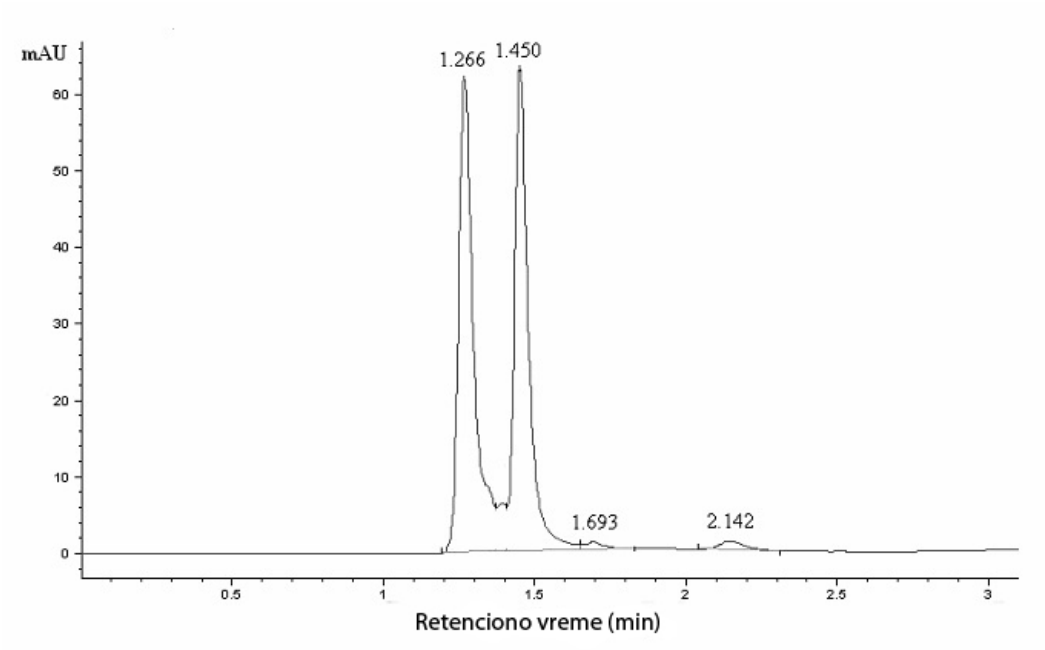


Šema 4.6. Prikaz mogućih reakcija u toku procesa autooksidacije GA u jako baznoj sredini. I - galna kiselina, II - elaginska kiselina.

Dobijeni spektri čistih komponenti ukazuju na postojanje samo jednog proizvoda autooksidacije što dovodi do pretpostavke da je način odvijanja procesa autooksidacije nezavistan od pH vrednosti u opsegu od 9,5 do 10,5. Ovo se može objasniti činjenicom da je u ovom opsegu pH vrednosti osim disocijacije karboksilne grupe moguća disocijacija samo jedne od hidroksilnih grupa GA (pKa_1 = 3,94, pKa_2 = 9,04, pKa_3 =11,17). Razlika između ovih procesa je samo u brzini autooksidacije. Ako se analiziraju koncentracioni profili $\boldsymbol{C}$ dobijeni metodom MCR-ALS može se uočiti da koncentracija galne kiseline (supstanca a) konstantno opada dok koncentracija proizvoda autooksidacije (supstanca b) konstantno raste u celokupnom vremenskom intervalu. Vremenska tačka kada se ove dve krive preseku može biti iskorišćena kao gruba procena brzine procesa. Za proces na pH 9,5 to je oko 10 minuta, a za procese na pH 10,0 i 10,5 ta vrednost je približno ista i nalazi se na oko 6 minuta. Zavisnost brzine procesa autooksidacije od pH rastvora može se objasniti koncentracijom hidroksilnih jona koji mogu imati uticaja na količinu nagrađenih hidroksilnih radikala. Naime, reakcija autooksidacije galne kiseline je po dobijenim matricama $\boldsymbol{S}^{\mathbf{T}}$ i $\boldsymbol{C}$ reakcija prvog reda, što podrazmeva da proizvod i brzina reakcije zavisi od koncentracije galne kiseline i njenog odgovarajućeg radikala. Količina nastalog radikala je u direknoj vezi sa količinom hidroksilih radikala koja se povećava sa povećanjem pH. Tačna vrednost konstante reakcije se ne može dobiti primenom *soft* MCR-ALS metode, pri čemu se, takođe, ne može se isključiti postojanje smeše proizvoda koji se identifikuje kao jedna komponenta.

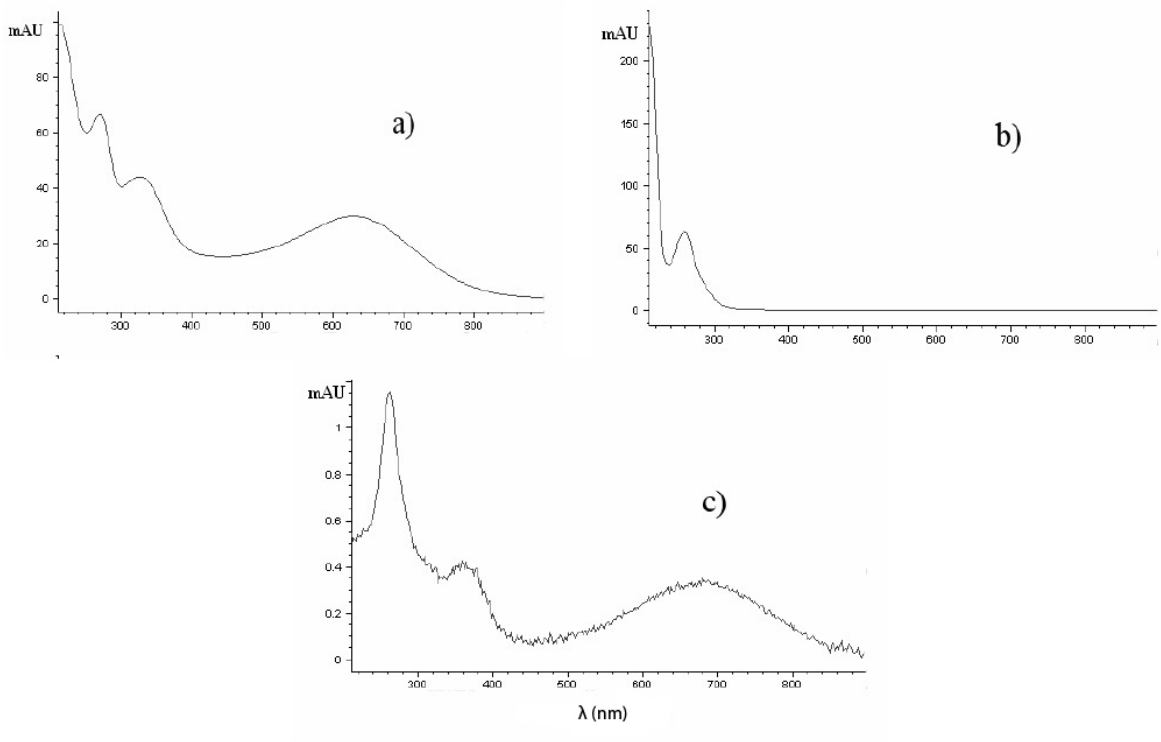
4.2.1.2. HPLC-DAD ispitivanje autooksidacije galne kiseline u baznim vodenim rastvorima

Na Slici 4.40. prikazan je hromatogram proizvoda autooksidacije galne kiseline na pH 10 u karbonatnom puferu. Literaturni podaci navode da je autooksidacija galne kiseline u baznoj sredini relativno brz proces. Takođe, predloženo je nekoliko mehanizama po kojima se proces autooksidacije odigrava [Friedman & Jurgens, 2000; Oniki & Takahama, 2004; Tulyathan *et al.*, 1989]. Hemijske strukture predloženih proizvoda su prikazane na slici 4.42.



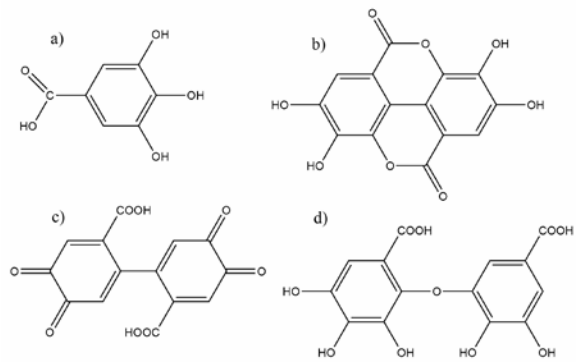
Slika 4.40. HPLC-DAD hromatogram proizvoda autooksidacije galne kiseline na pH 10 nakon vremena od 45 minuta (detekciona talasna dužina iznosi 258 nm).

Na hromatogramu sa slike 4.40. mogu se uočiti dva glavna pika sa retencionim vremenima (RT) od 1,266 i 1,450 min i dva manja pika koja se javljaju na RT od 1,693 i 2,142 min. Pik čija je vrednost za RT 1,450 min odgovara galnoj kiselini, što je potvrđeno poređenjem sa RT vrednošću neokisdovane čiste galne kiseline. Određene pretpostavke u vezi strukture proizvoda autooksidacije mogu se izvesti na osnovu njihovih RT vrednosti i UV/Vis spektara prikazanih na slici 4.41.



Slika 4.41. UV/Vis spektri jedinjenja sa HPLC hromatograma prikazanog na slici 4.42. na RT vredonstima: a) 1,226; b) 1,450 i c) 2,142 min.

Dobro definisani pik sa RT od 1,266 min odgovara jednoj komponenti koja je polarnija od galne kiseline, jer je korišćen sistem obrnutih faza, i ovo jedinjenje može da predstavlja jedan od dimera pošto sadrži dve karboksilne grupe. Međutim, UV/Vis spektar ovog jedinjenja ne može da dâ definitivni odgovor u vezi strukture pošto oba dimera imaju produženu π elektronsku delokalizaciju (slika 4.42.) koja rezultuje u pojavi novih apsorpcionih traka na višim talasnim dužinama u poređenju sa galnom kiselinom.

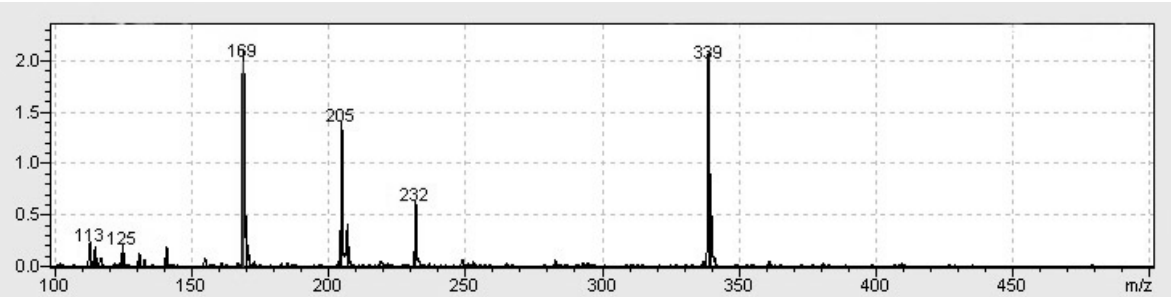


Slika 4.42. Hemijske strukture: a) galne kiseline; b) elaginske kiseline; c) C-C dimera i d) C-O dimera galne kiseline.

Na osnovu RT vrednosti i UV/Vis spektra može se samo pretpostaviti da je ovaj proizvod autooksidacije najverovatnije dimer galne kiseline. Za jedinjenje čiji se hromatografski pik javlja na RT vrednosti od 2,142 min se može pretpostaviti da predstavlja elaginsku kiselinu (EA) jer odgovarajući UV/Vis spektar ima dovoljno sličnosti sa spektrom ovog jedinjenja koji je prikazan u literaturi [Gil *et al.*, 2000], a elaginska kiselina je već identifikovana kao jedan od proizvoda autooksidacije galne kiseline u baznim vodenim rastvorima [Tulyathan *et al.*, 1989]. Osim toga, odnos RT vrednosti ovog jedinjenja i galne kiseline je skoro identičan odnosu koji je naveden u literaturi za hromatogram snimljen pod vrlo sličnim uslovima [He & Xia, 2007]. Jedinjenje čiji se veoma slabo izražen hromatografski pik javlja na RT vrednosti od 1,693 min nije okarakterisano, a moguće je i da predstavlja nečistoću.

4.2.1.3. ESI-MS analiza

Na Slici 4.43. je prikazan maseni spektar vodenog rastvora galne kiseline (pH 7,0) odmah nakon pripreme.

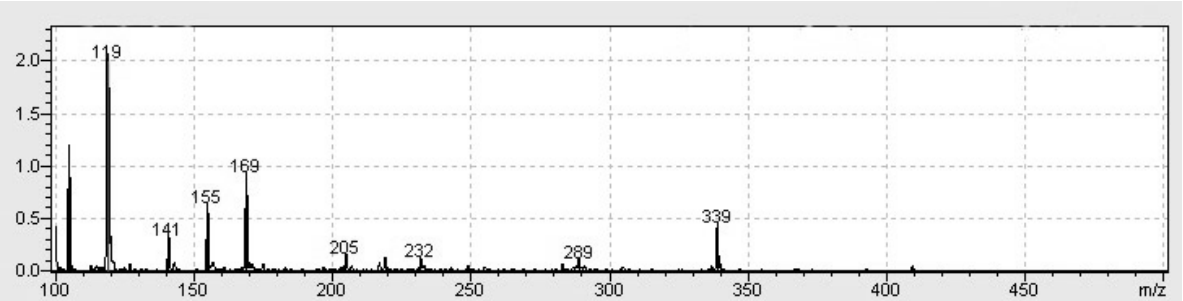


Slika 4.43. ESI-MS spektar vodenog rastvora galne kiseline na pH 7,0. Vreme autooksidacije 0 min.

Dva najkarakterističnija signala u ESI-MS spektru galne kiseline pre početka autooksidacije odgovaraju jonima sa m/z vrednostima 169 i 339. Jon na m/z vrednosti 169 je molekulski $[GA - H]^-$ jon galne kiseline nastao odlaskom H^+ jona iz molekula galne kiseline, dok je jon na m/z vrednosti 339 najverovatnije $[2GA - H]^-$ jon u kome su dva molekula galne kiseline povezana sa dve vodonične veze. U ESI-MS spektru vodenog rastvora galne kiseline na pH 4 koji je prikazan u literaturi [Melo *et al.*, 2009] uočava se prisustvo samo ova dva jona pri čemu je intenzitet signala jona na m/z vrednosti 169 više od 4 puta veći od signala jona na m/z vrednosti 339. U spektru prikazanom na slici 4.43. prisutni su i drugi joni, a naročito su intenzivni signali jona na m/z vrednostima 205 i 232. Jon na m/z vrednosti 205 mogao bi da bude dvostruko hidratisani $[GA + 2H_2O - H]^-$ jon. Jon na m/z vrednosti 232 bi mogao da

bude dvostruko negativno naelektrisani jon složene strukture $[2GA + PG - 2H]^{2-}$ ukoliko se pretpostavi da u jonizacionoj komori dolazi do dekarboksilacije galne kiseline i formiranja pirogalola koji bi gradio adukt sa dva molekula galne kiseline. Na ovu mogućnost ukazuje i prisustvo signala slabog intenziteta na m/z vrednosti 125 koji odgovara molekulskom $[PG - H]^{-}$ jonu pirogalola.

Na slici 4.44. je prikazan maseni spektar vodenog rastvora galne kiseline na pH 8,5 nakon 4 sata autooksidacije.



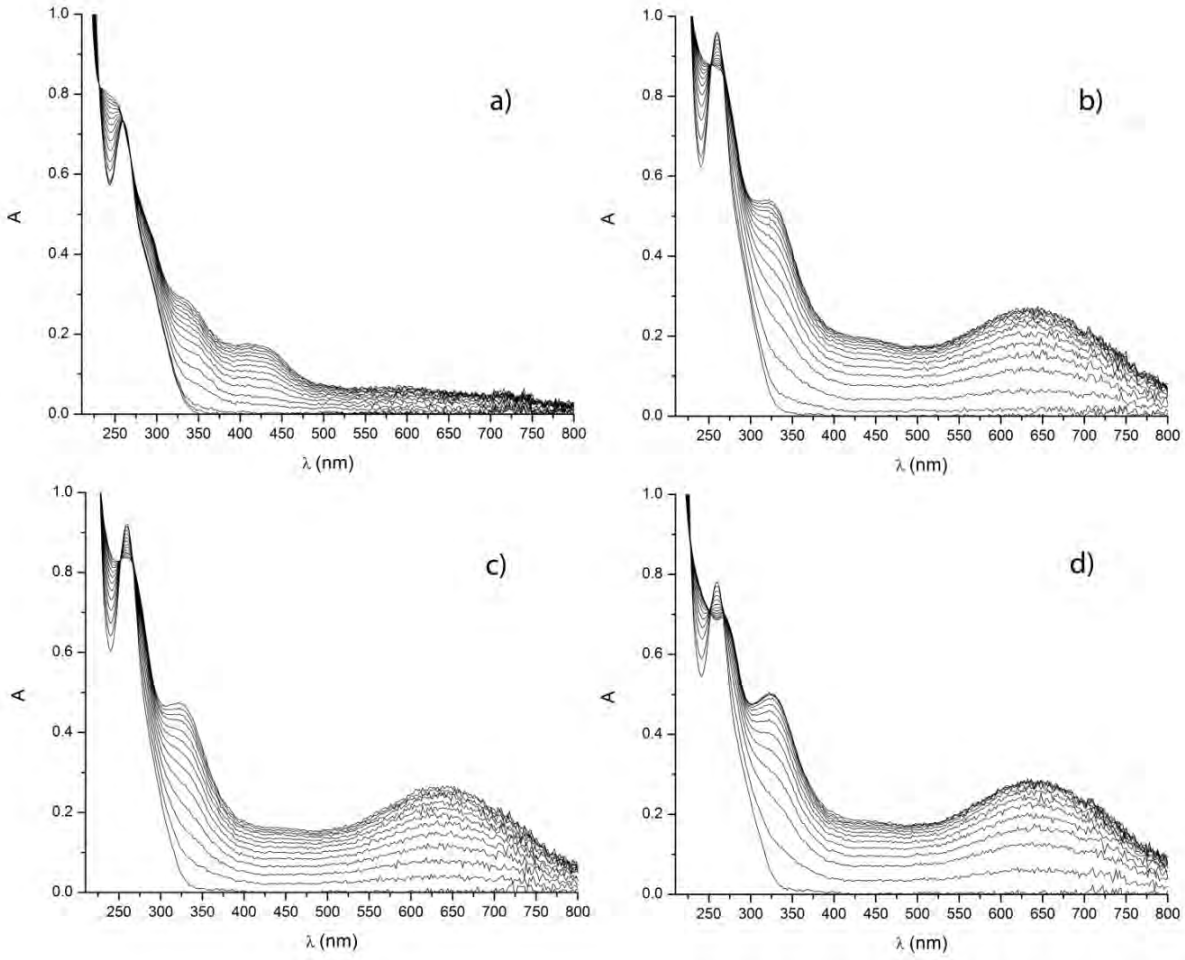
Slika 4.44. ESI-MS spektar vodenog rastvora galne kiseline na pH 8,5. Vreme autooksidacije 4 h.

U spektru prikazanom na slici 4.44. javljaju se signali jona sa m/z vrednostima 169, 205, 232 i 339 kao i u spektru same galne kiseline pre početka autooksidacije (slika 4.43.), ali je najintezivnijiji signal koji potiče od jona čija je m/z vrednost 119. Prisustvo ovog jona i jona čija je m/z vrednost 105 uočeno je i u ESI-MS spektru pirogalola nakon autooksidacije i može se objasniti raskidanjem veza u prstenu i formiranjem istih degradacionih proizvoda kao i kod pirogalola, što je prikazano na šemi 4.3. Signali koji potiču od jona sa m/z vrednostima 141 i 155 se takođe javljaju i u ESI-MS spektru pirogalola nakon autooksidacije i njihovo nastajanje se može objasniti na analogan način (šema 4.4.) uz pretpostavnu da je u jonizacionoj komori došlo do dekarboksilacije galne kiseline i formiranja pirogalola.

4.2.2. Autooksidacija galne kiseline u prisustvu dvovalentnih dijamagnetnih jona zemnoalkalnih metala

4.2.2.1. UV/Vis spektralna analiza

Na Slici 4.45. su prikazani UV/Vis spektri snimljeni u toku procesa autooksidacije galne kiseline (GA) u vodenom rastvoru na pH 7,4 (fiziološka pH vrednost) u prisustvu jona zemnoalkalnih metala: a) Mg(II), b) Ca(II), c) Sr(II) i d) Ba(II). Različiti spektralni profili koji se mogu uočiti u ova četiri slučaja potvrđuju zavisnost autooksidacije galne kiseline od vrste prisutnog zemnoalkalnog M(II) jona. Spektralni profil za proces autooksidacije u prisustvu Mg(II) jona je kompleksniji u odnosu na ostale procese sa mogućim formiranjem više autooksidacionih proizvoda. Analiza spektara dobijenih prilikom autooksidacije galne kiseline u prisustvu Mg(II) jona ukazuje na kontinualno smanjenje inteziteta apsorpcionog maksimuma na oko 260 nm. Intenzitet apsorpcije na oko 240 nm (apsorpcioni minimum u spektru galne kiseline pre početka autooksidacije) se kontinuirano povećava tako da dolazi do pojave pregiba na oko 250 nm. Pored navedenog javljaju se još dva pregiba na oko 300 nm i 350 nm. Uočava se i pojava širokih apsorpcionih maksimuma u vidljivoj oblasti na oko 425 nm i 600 nm, kao i pojava dve izobestičke tačke na oko 230 nm i 275 nm.



Slika 4.45. UV/Vis spektri snimljenu u toku procesa autooksidacije GA (C(GA) = 300 μmol dm^{-3}, pH 7,4; C(M(II)) = 0,1 mol dm^{-3}, vremenski interval snimanja 5 minuta) u prisustvu: a) Mg(II), b) Ca(II), c) Sr(II) i d) Ba(II) jona.

Vizuelno poređenje spektara snimljenih u toku autooksidacije galne kiseline u prisustvu Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona pokazuje da su ovi procesi međusobno veoma slični. Intezitet apsorpcionog maksimuma na oko 260 nm se konstantno smanjuje, dok intenzitet apsorpcije na oko 240 nm (apsorpcioni minimum u spektru galne kiseline pre početka autooksidacije) konstantno raste. Javljaju se dva nova apsorpciona maksimuma, jedan u UV oblasti na oko 325 nm, a drugi u vidljivoj oblasti na oko 640 nm. Takođe, uočava se pojava tri izobestičke tačke, na oko 230 nm, 250 nm i 275 nm.

Grafička analiza snimljenih spektara matričnom metodom pokazala je da se u ovim sistemima nalaze dve apsorbujuće čestice u ravnoteži.

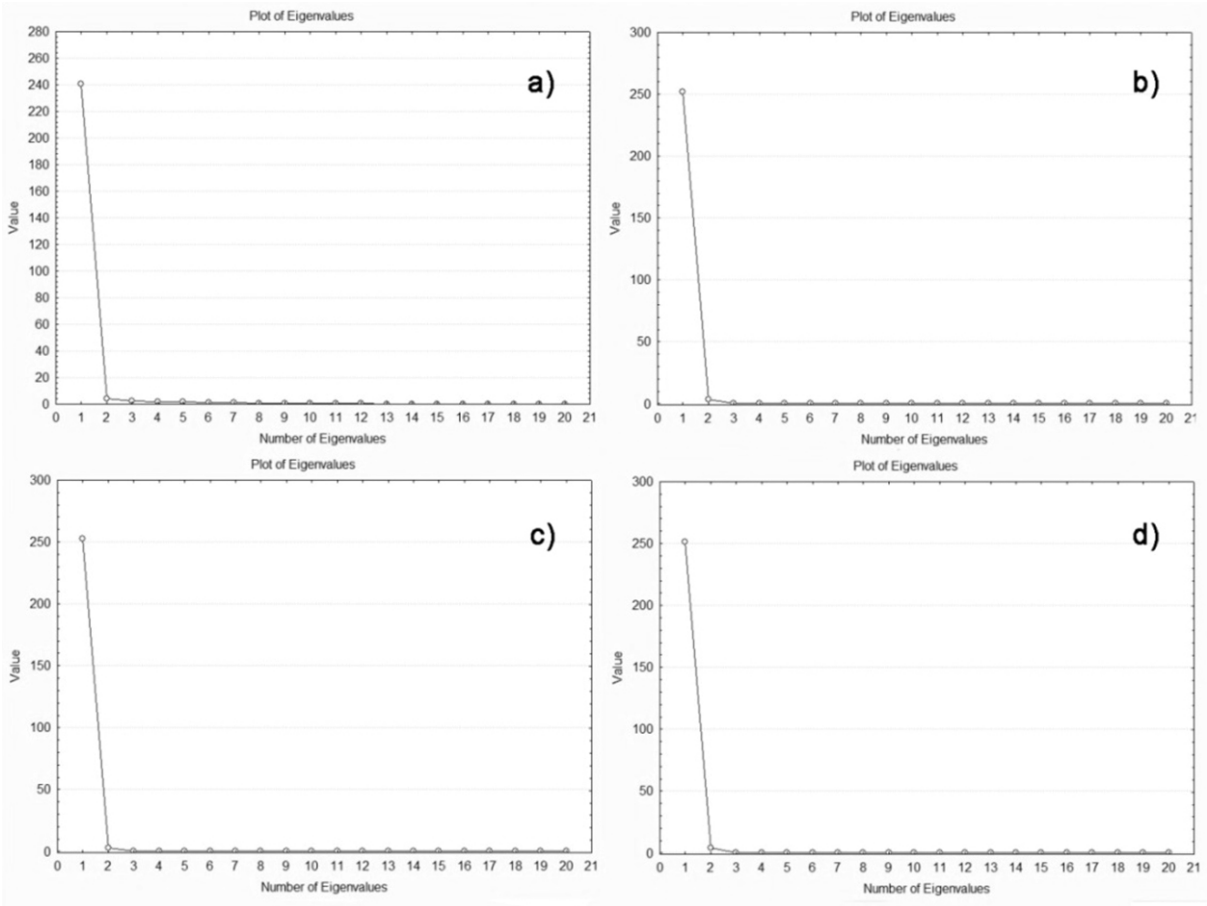
Radi dalje analize procesa primenjena je MCR-ALS metoda. Prvi korak bio je konstruisanje matrica ***D*** po principima definisanim u Poglavlju 2.4.1.2. Sledeći korak bio je određivanje

jedinstvenih vrednosti primenom SVD. Tabela 4.8. prikazuje jedinstvene vrednosti dobijene primenom SVD za procese autooksidacije galne kiseline u prisustvu Mg(II), Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona. Podaci za jedinstvene vrednosti za procese u prisustvu Mg(II), Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona na pH 7,4 pokazuju da proces prati jednostavan mehanizam sa dve apsorbujuće čestice. Iz tog razloga su u matricama $\boldsymbol{D_{GA\text{-}Mg}}$, $\boldsymbol{D_{GA\text{-}Ca}}$, $\boldsymbol{D_{GA\text{-}Sr}}$ i $\boldsymbol{D_{GA\text{-}Ba}}$ značajne dve svojstvene vrednosti.

Tabela 4.8. Rang analiza matrica $\boldsymbol{D_{GA\text{-}Mg}}$, $\boldsymbol{D_{GA\text{-}Ca}}$, $\boldsymbol{D_{GA\text{-}Sr}}$, $\boldsymbol{D_{GA\text{-}Ba}}$ (prikazano je prvih pet jedinstvenih vrednosti).

Faktori	Mg	Ca	Sr	Ba
1	18,8734	30,963	29,0316	26,3895
2	3,22768	5,97476	4,87468	5,36868
3	0,216747	0,455888	0,442285	0,272735
4	0,0889344	0,376994	0,18585	0,213196
5	0,0792996	0,223226	0,161875	0,108409

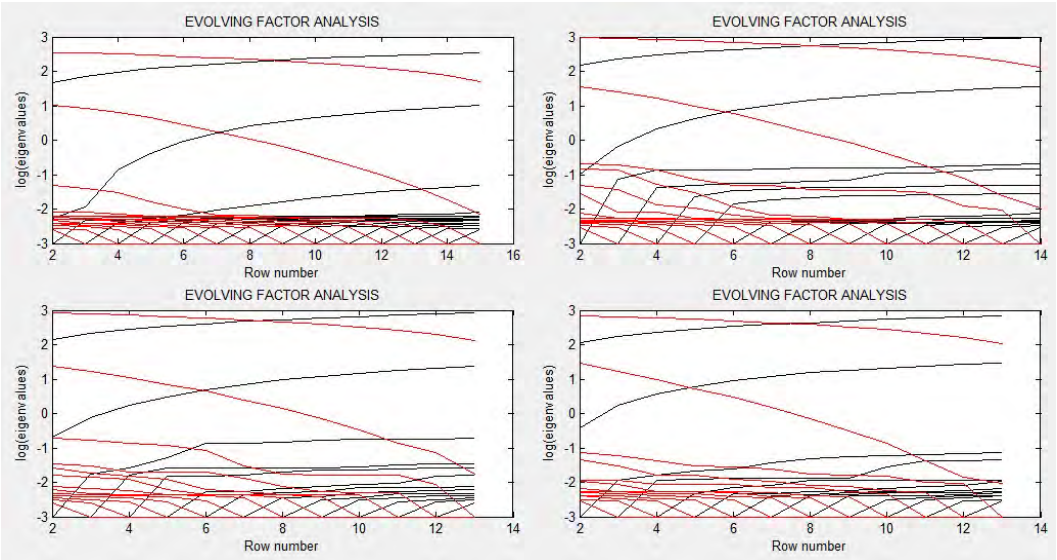
Za procenu ranga matrica apsorbancija primenjen je *scree* grafički prikaz u faktorskoj analizi (FA). Slika 4.46. prikazuje *scree* grafički prikaz FA za proces autooksidacije galne kiseline u prisustvu Mg(II), Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona na pH 7,4.



Slika 4.46. *Scree* grafički prikaz u faktorskoj analizi (FA) za proces autooksidacije galne kiseline na pH 7,4 u prisustvu a) Mg(II), b) Ca(II), c) Sr(II) i d) Ba(II) jona.

Rezultati prikazani na slici 4.35. pokazuju da je za proces autooksidacije galne kiseline na pH 7,4 u prisustvu Mg(II), Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona broj svojstvenih vrednosti dva za sve procese.

Slika 4.47. predstavlja EFA grafički prikaz za procese autooksidacije galne kiseline na pH 7,4 u prisustvu Mg(II), Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona. Analiza unapred podataka za sve procese pokazuje da se promene spektralnih podataka od samog početka autooksidacije mogu objasniti preko dva faktora. Prisustvo dva faktora od samog početka reakcije može se povezati sa prisustvom dva jedinjenja u reakciji u kojoj dolazi do autooksidacije galne kiseline. Iste informacije se dobijaju i pomoću analize unazad matrica $\boldsymbol{D}_{GA\text{-}Mg}$, $\boldsymbol{D}_{GA\text{-}Ca}$, $\boldsymbol{D}_{GA\text{-}Sr}$ i $\boldsymbol{D}_{GA\text{-}Ba}$.



Slika 4.36. EFA grafički prikaz matrica spektralnih podaka (***D***$_{GA\text{-}Mg}$ gore levo, ***D***$_{GA\text{-}Ca}$ gore desno, ***D***$_{GA\text{-}Sr}$ dole levo i ***D***$_{GA\text{-}Ba}$ dole desno). Pravci analize: unapred (crne linije) i unazad (crvene linije).

Vrednosti dobijene iz *scree* grafičkog prikaza (*eigenvalues*) u FA analizi i EFA grafičke analize (*log of eigenvalues* korišćen u ALS) su identične i iznose dva. Informacije o jedinjenjima koja su uključena u proces autooksidacije se mogu dobiti primenom MCR-ALS analize matrica ***D***$_{GA\text{-}Mg}$, ***D***$_{GA\text{-}Ca}$, ***D***$_{GA\text{-}Sr}$ i ***D***$_{GA\text{-}Ba}$.

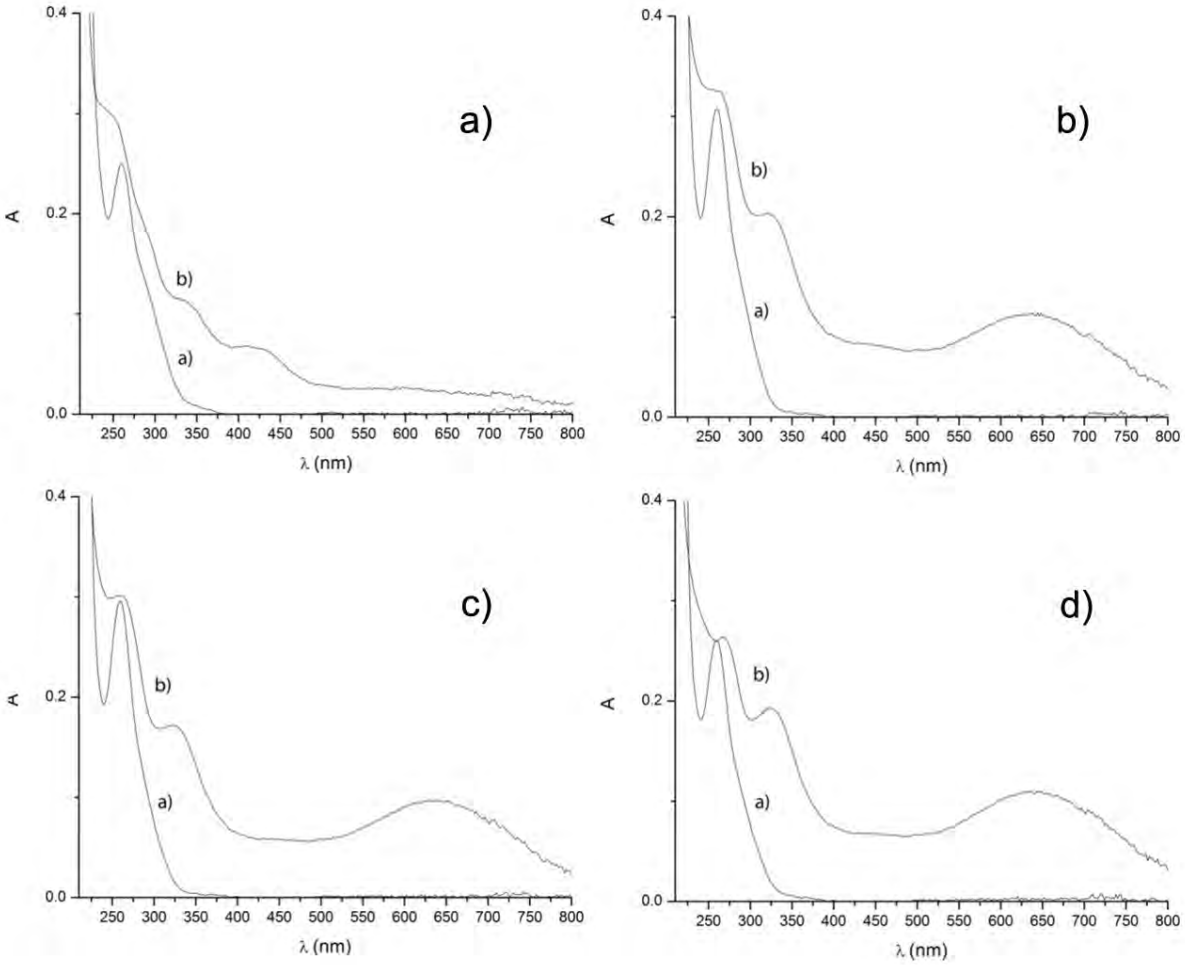
Eksperimentalni podaci su obrađeni korišćenjem *soft* MCR-ALS metode primenom uslova ne-negativnosti (za koncentraciju i spektre) i jednoznačnosti (za koncentracijone profile). Primena MCR-ALS analize je izdvojila dve čestice za procese autooksidacije galne kiseline u prisustvu Mg(II), Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona. LOF% za sva četri procesa je bio niži od 1%. Tabela 4.9. prikazuje procenu kvaliteta razdvajanja korišćenjem standardne devijacije ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke, greške fitovanja i objašnjene varijance.

Tabela 4.9. Kvalitet razdvajanja procenjen korišćenjem standardne devijacije ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke, LOF% i objašnjene varijance.

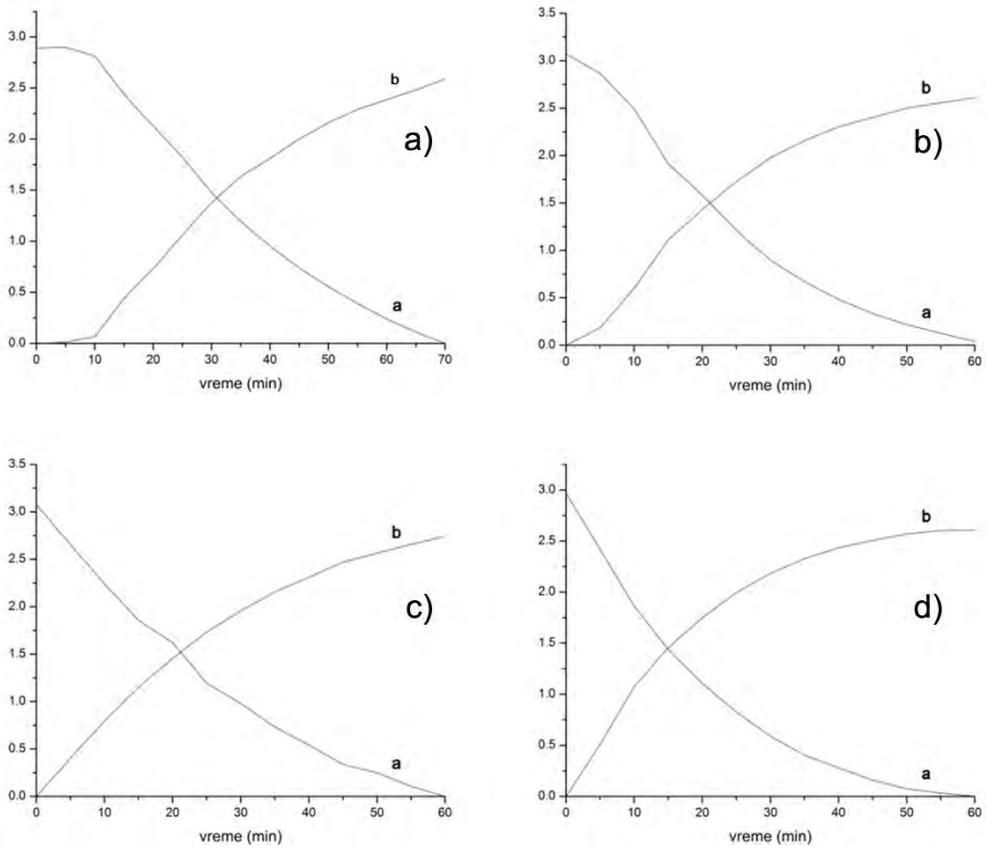
	Mg	Ca	Sr	Ba
SdRex	0,0046013	0,0098059	0,0082399	0,0062242
LOF% (PCA)	0,34395	0,12634	0,11969	0,11028
LOF% (exp)	1,7184	2,1637	1,8769	1,5499
r^2	99,9705	99,9532	99,9648	99,976

SdRex – standardna devijacija ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke
LOF% – *lack-of-fit* za PCA i eksperiment
r^2 – procenat objašnjene varijance

Slika 4.48. prikazuje odgovarajuće spektre čistih komponenti ($\boldsymbol{S}^{\mathbf{T}}$) za sva četri procesa, dok slika 4.49. prikazuje izračunate koncentracione profile ($\boldsymbol{C}$) komponenti koje se javljaju u procesu autooksidacije galne kiseline.



Slika 4.48. Spektri čistih komponenti ($\boldsymbol{S}^{\mathbf{T}}$) dobijeni MCR-ALS metodom za procese autooksidacije galne kiselina u prisustvu: a) Mg(II), b) Ca(II), c) Sr(II) jona i d) Ba(II) jona.



Slika 4.49. Kinetički profili (***C***) određeni MCR-ALS metodom za procese autooksidacije galne kiseline na pH 7,4 u prisustvu: a) Mg(II), b) Ca(II), c) Sr(II) i d) Ba(II) jona.

Kod procesa autooksidacije galne kiseline u prisustvu Mg(II), Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona MCR-ALS metodom identifikovan je samo po jedan proizvod reakcije. U autooksidacionim procesima galne kiseline u prisustvu jona Ca(II), Sr(II) i Ba(II) identifikovani proizvodi autooksidacije imaju praktično identične spektralne karakteristike dok se proizvod autooksidacije dobijen u prisustvu Mg(II) jona značajno razlikuje. U toku celokupnog vremenskog intervala u kome su snimani UV/Vis spektri dolazi do konstantnog opadanja koncentracije galne kiseline (jedinjenje a)) i povećanja koncentracije proizvoda autooksidacije (jedinjenja b)). Ako se uporede koncentracioni profili supstanci a) i b) može se uočiti da postoji razlika u brzini opadanja koncentracije supstance a) i povećanja koncentracije supstance b) u zavisnosti od toga koji je od M(II) jona zemnoalkalnih metala prisutan u rastvoru. Vreme kada se koncentracione krive supstanci a) i b) seku može da posluži za procenu brzine samog procesa U slučaju kada je u rastvoru prisutan Ca(II) jon to je oko 20 minuta, kod Sr(II) jona to je takođe oko 20, a kod Ba(II) jona oko 15 minuta. I u pogledu ove karakteristike se proces autooksidacije galne kiseline u prisustvu Mg(II) jona

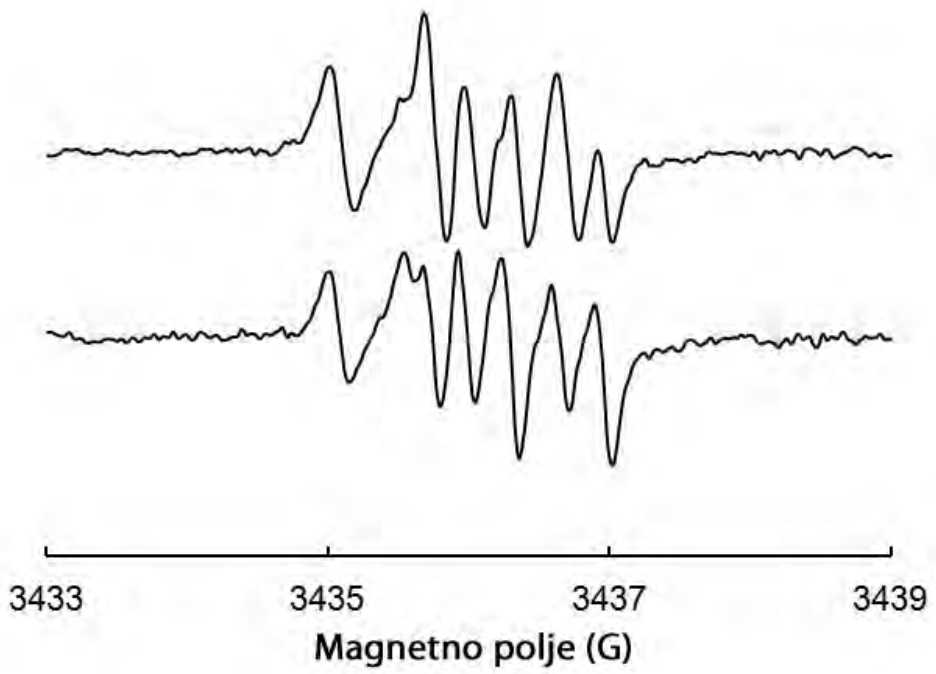
značajno razlikuje jer, osim što se koncentracione krive supstanci a) i b) seku posle najdužeg vremena (oko 30 minuta) što ukazuje na najsporije odvijanje procesa, postoji i određena ″zadrška″ (oko 5-10 minuta) do početka procesa.

4.2.2.2. ESR analiza

Slobodni radikali koji se dobijaju tokom procesa autooksidacije galne kiseline u vodenim rastvorima su detaljno proučavani primenom ESR spektroskopije [Yoshioka *et al.*, 2003; Eslami *et al.*, 2010]. Na pH > 10 u ESR spektrima se javlja karakterističan triplet sa odnosom inteziteta 1 : 2 : 1 između tri linije. Ovakav izgled spektra dokaz je postojanja interakcije nesparenog elektrona sa dva ekvivalenta protona u strukturi slobodnog radikala, a vrednost konstante hiperfinog cepanja iznosi 1,07 G. Međutim, ESR spektar galne kiseline u puferu na pH 9, iako sa lošim odnosom signal/šum, pokazuje prisustvo slobodnog radikala sa tri neekvivalentna protona u svojoj strukturi [Eslami *et al.*, 2010]. U literaturi nema podataka da je detektovano fromiranje slobodnih radikala galne kiseline u vodenim rastvorima na pH vrednosti nižoj od 9.

ESR spektroskopija je takođe korišćena za direktnu detekciju karakterističnih slobodnih radikala galne kiseline u kompleksnim sistema kao što su peroksidacija lipidnih sistema [Milić *et al.*, 1998], ili u nekim mediciskim biljkama [Mouhajir *et al.*, 2001] kao i u mešavini polifenola iz zelenog čaja [Severino *et al.*, 2009]; za proučavanje interakcija galne kiseline sa drugim antioksidansima [Nogaki *et al.*, 1998; Sakagami i Satoh, 1996] ili sa paramagnetnim metlnim jonima [Severino *et al.*, 2011]; za karakterizaciju sekundarnih radikala koji se dobijaju oksidacijom galne kiseline sa $K_4[Fe(CN)_6]$ na visokim pH vrednostima [Oniki & Takahama, 2004], ali i za proučavanje karakteristika i interakcija drugih antioksidansa koje imaju u osnovi strukturu pirogalola [Pasanphan *et al.*, 2010; Perron *et al.*, 2011]. U nekim ESR studijama proantocijanidina i estara galne kiseline korišćena je tehnika spinske stabilizacije [Bors *et al.*, 2000].

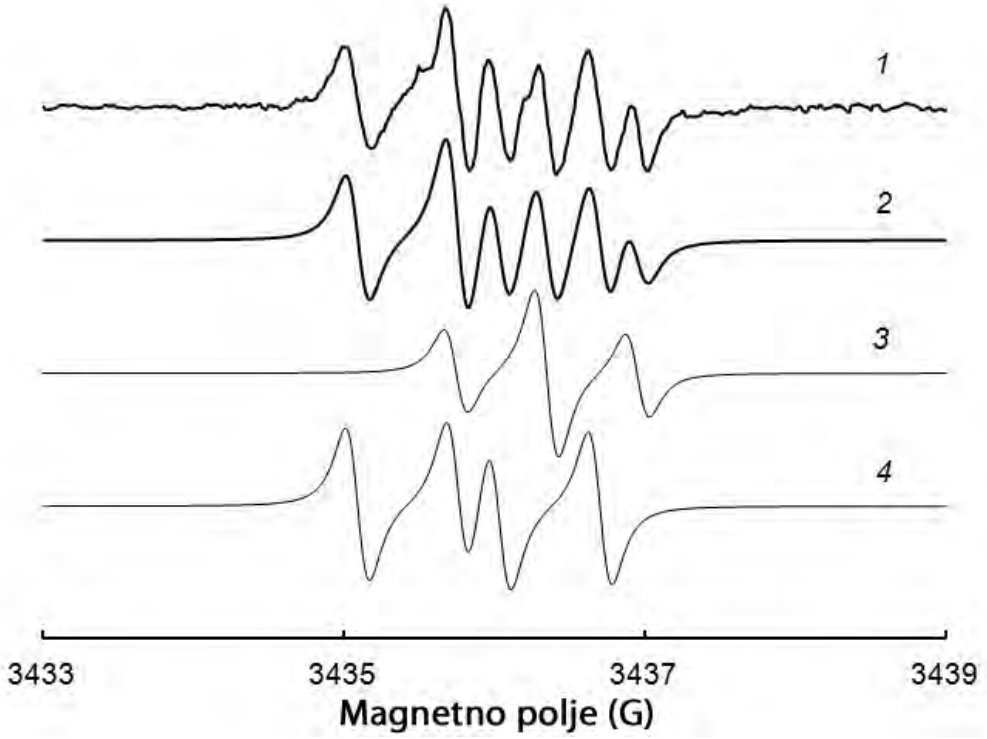
Radi ispitivanja procesa autooksidacije galne kiseline u slabo baznim vodenim rastvorima na sobnoj temperaturi u prisutvu Mg(II) jona primenjenja je tehnika spinske stabilizacije [Nikolić G.M. et al., 2011b]. Na slici 4.50. su prikazani ESR spektari dobijeni za dve različite koncentracije galne kiseline snimljeni u intervalu manjem od 3 minuta nakon mešanja rastvora galne kiseline sa Tris puferom (pH 8,5) koji sadrži Mg(II) jone.



Slika 4.50. ESR spektri slobodnih radikala dobijenih za vreme autooksidacije galne kiseline u vodenim rastvorima na pH 8,5 u prisustvu Mg(II) jona, koncentracija galne kiseline 5 mmol dm^{-3} (gornji spektar) i 20 mmol dm^{-3} (donji spektar).

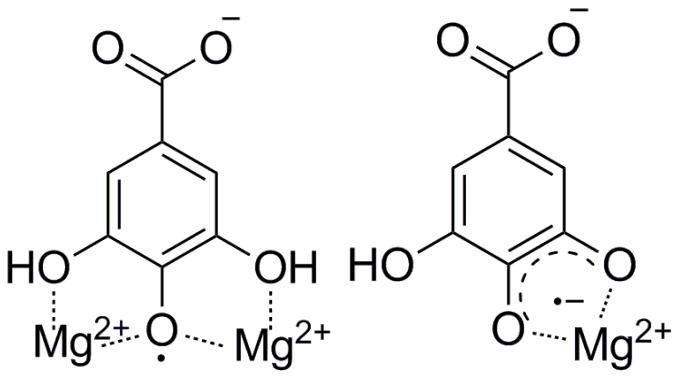
Asimetrični izgled ESR spektara prikazanih na slici 4.50. jasno ukazuje da se u početnoj fazi autooksidacije galne kiseline u prisustvu Mg(II) jona na pH 8,5 formiraju bar dve ili više različitih slobodnoradikalskih vrsta. Nakon produženog vremena autooksidacije (do 2 sata) opšti izgled ESR spektra se nije promenio, ali se ukupni intezitet signala smanjio uz značajno pogoršanje odnosa signal/šum. Pokušaji da se dobiju zadovoljavajući ESR spektri na nižim vredonstima pH i bez prisustva Mg(II) jona nisu dali zadovoljavajuće reziltate.

Struktura slobodnih radikala koji se formiraju za vreme autooksidacije galne kiseline u vodenim rastvorima na pH 8,5 u prisustvu Mg(II) jona je određena kompjuterskom simulacijom ESR spektara. Zadovoljavajuća kompjuterska simulacija prikazanih ESR spektara je dobijena korišćenjem pretpostavke da postoje dve različite radikalske vrste u rastvoru. Na slici 4.51. su prikazani eksperimentalni ESR spektri snimljeni u toku autooksidacije galne kisleline na pH 8,5 u prisustvu Mg(II) jona (C(GA) = 5 mmol dm^{-3}), kompjuterski simuliran ESR spektar i individualne komponente kompjuterski simuliranog spektra.



Slika 4.51. Eksperimentalni ESR spektar galne kiseline na pH 8,5 u vodenom rastvoru sa Mg(II) jonima (1), kompjuterski simuliran spektar (2), i individualne komponente kompjuterski simuliranog spektra (3 i 4).

Individualne komponente kompjuterski simuliranog spektra odgovaraju jednom slobodnom radikalu sa dva ekvivalentna protona (triplet sa odnosom inteziteta signala 1 : 2 :1) i jednom slobodnom radikalu sa dva neekvivalentna protona (donekle preklapajući kvartet sa odnosom inteziteta signala 1 : 1 : 1 : 1). Prvi radikal očigledno predstavlja spinski stabilizovan primarni radikal galne kiseline (slika 4.51). Mnogo manja vrednost konstante hiperfinog cepanja (0,60 G) u poređenju sa vrednošću koja se u literaturi navodi za anjonski radikal galne kiseline dobijen tokom autooksidacije na pH 11 (1,07 G [Eslami *et al.*, 2010]) je u skladu sa sličnim promenama vrednosti konstante hiperfinog cepanja za *orto*-benzosemihinonski anjon radikal koji je spinski stabilizovan Mg(II) jonima [Eaton, 1964]. Sekundarni radikal ima strukturu sa dva neekvivalentna protona čije konstante hiperfinog cepanja iznose 0,94 G i 0,67 G. Ova struktura je dosta različita od strukture sekundarnog radikala koji se dobija prilikom oksidacije galne kiseline sa $K_4[Fe(CN)_6]$ na visokim pH vrednostima i koji je pomoću ESR spektra nedvosmisleno identifikovan kao C-O-C dimer galne kiseline [Oniki & Takahama, 2004]. Predložene strukture pimarnog i sekundarnog radikala su prikazane na slici 4.52.

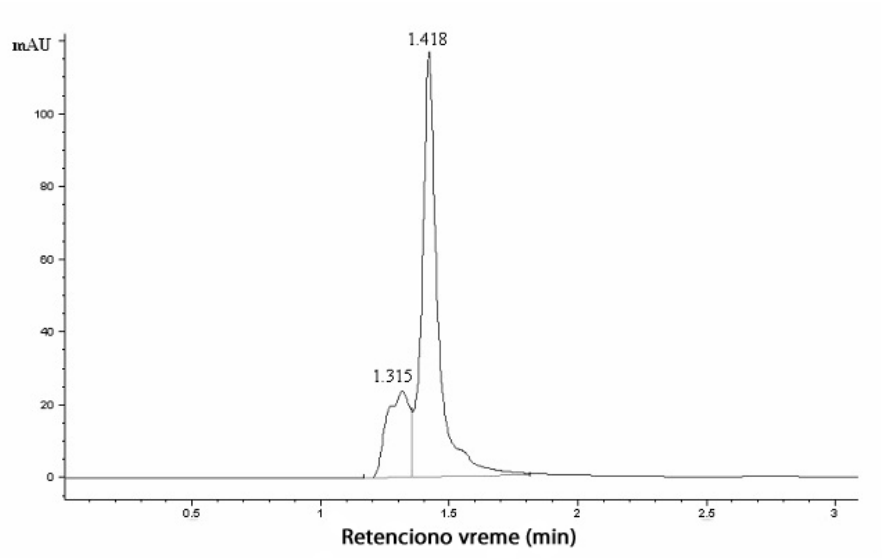


Slika 4.52. Predložene strukture primarnog (levo) i sekundarnog (desno) slobodnog radikala koji se formiraju tokom autooksidacije galne kiseline u vodenim rastvorima na pH 8,5 u prisustvu Mg(II) jona.

Kompjuterska simulacija eksperimentalno dobijenog ESR spektra za autooksidaciju galne kiseline u vodenom rastvoru na pH 8,5 u prisustvu Mg(II) jona pri koncentraciji od 20 mM je takođe dala zadovoljavajuće rezultate sa istim slobodnim radikalima i glavna razlika je relativna zastupljenost slobodnih radikala pri različitim koncentracijama galne kiseline. Sa povećanjem koncentracije galne kiseline zastupljenost primarnog radikala se povećava od oko 25% (na 5 mmol dm^{-3}) do oko 50% (na 20 mmol dm^{-3}).

4.2.2.3. HPLC-DAD ispitivanje uticaja Mg(II) jona na proces autooksidacije galne kiseline u baznim vodenim rastvorima

Na slici 4.53. prikazan je hromatogram koji pokazuje razdvajanje proizvoda dobijenih u toku autooksidacije galne kiseline na pH 8,5 u prisustvu Mg(II) jona. Dobro definisani glavni pik na retencinonom vremenu (RT) od 1,418 min potiče od neoksidovane galne kiseline. U prikazanom hromatogramu javlja se još jedan, salbo razdvojen, pik na RT od 1,315 min. Ako se uporede hromatogrami dobijeni nakon autooksidacije galne kiseline pri različitim uslovima, može se zaključiti da je brzina autooksidacije u prisustvu Mg(II) jona na pH 8,5 sporiji proces u odnosu na autooksidaciju galne kiseline u vodenom rastvoru bez prisustva Mg(II) jona na pH 10.

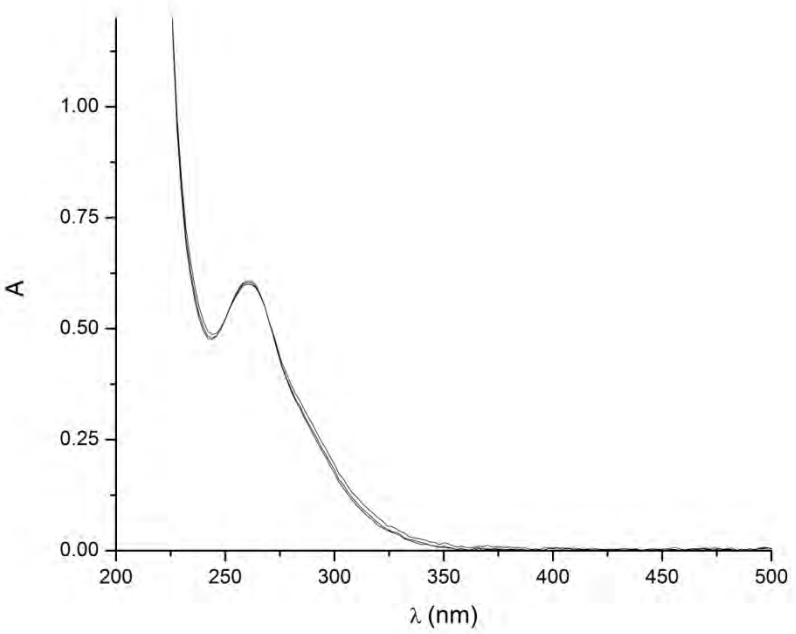


Slika 4.53. HPLC hromatogram proizvoda autooksidacije galne kiseline na pH 8,5 nakon 45 minuta vreme u prisustvu Mg(II) jona (detekciona talasna dužina iznosi 258 nm).

Ova činjenica se može objasniti ne samo uticajem manje vredonsti pH, što generalno smanjuje brzinu autooksidacije polifenolnih jedinjenja [Friedman & Jurgens, 2000], već i spinskom stabilizacijom prelaznog slobodnog od strane Mg(II) jona [Lebedev *et al.*, 2007; Nikolić *et al.*, 1998; 2011]. Još važnije, izgled manjeg hromatografskog pika na RT od 1,315 min sa pregibom na nižoj RT vrednosti pokazuje da ovaj pik potiče od najmanje dva jedinjenja. Navedene činjenice dovode do pretpostavke da prisustvo Mg(II) jona ne samo da utiče na brzinu autooksidacije galne kiseline, već menja i mehanizam reakcije.

4.2.3. Autooksidacija galne kiseline u prisustvu Zn(II), Cd(II) i Pb(II) jona

Proces autooksidacije galne kiseline je praćen spektrofotometrijski na pH 5,5 pri koncentraciji Zn(II), Cd(II) i Pb(II) jona od 0.1 mol/dm^3 i u vremenu do 2 dana (slika 4.54). Pod navedenim uslovima nisu uočene značajne promene u UV/Vis spektrima sa vremenom što ukazuje da nije došlo do autooksidacije galne kiseline.



Slika 4.54. UV/Vis spektri vodenog rastvora galne kiseline u prisustvu Zn(II) jona (C(GA) = 300 μmol dm^{-3}, interval snimanja 5 h; pH 5,5; C(Zn(II)) = 0,1 mol dm^{-3}).

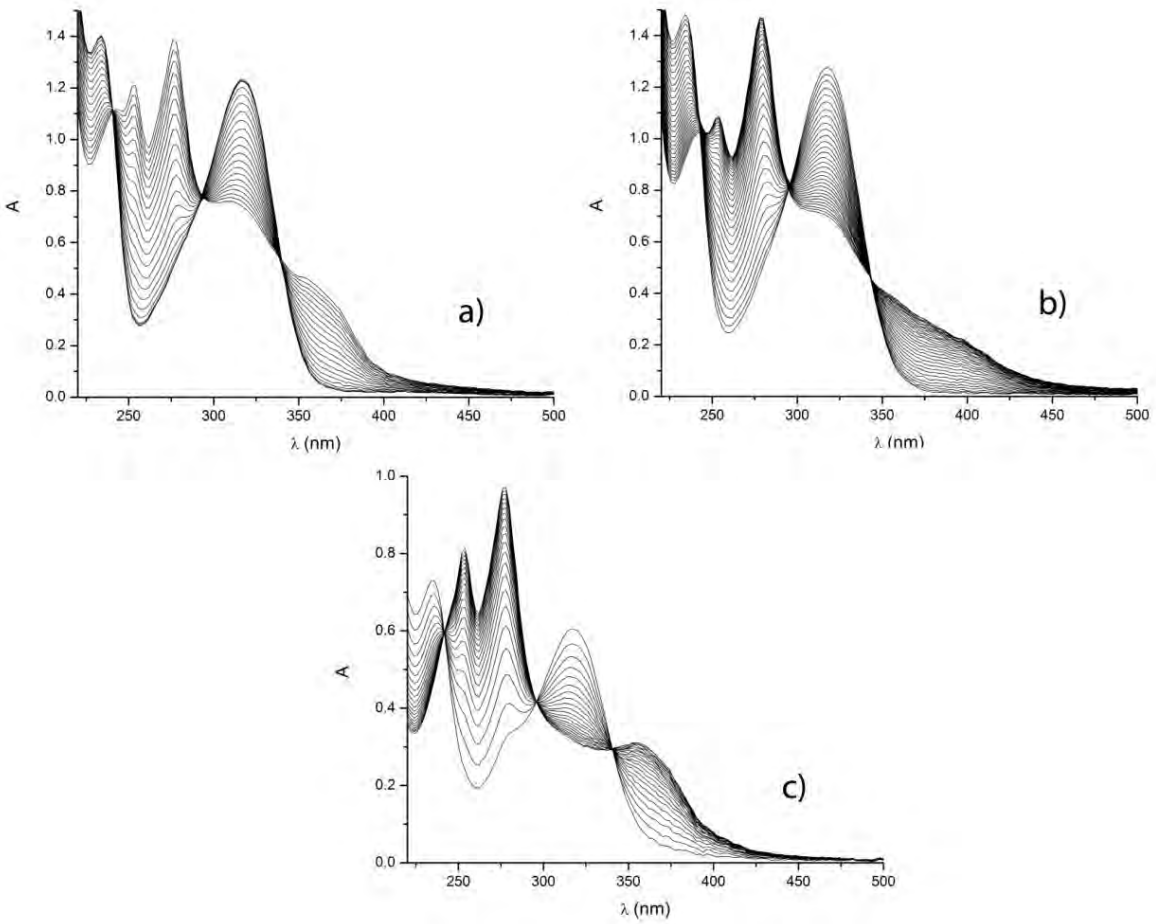
Pod navedenim uslovima autooksidacije galne kiseline u prisustvu Pb(II) i Cd(II) jona nisu dobijeni UV/Vis spektri pogodni za dalju analizu.

4.3. Etil-galat

4.3.1. Autooksidacija etil-galata u slabo baznim vodenim rastvorima

4.3.1.1. UV/Vis spektralna analiza

Na slici 4.55. su prikazani UV/Vis spektri snimljeni u toku autooksidacije etil-galata (EG) u vodenom rastvoru na pH a) 9,0; b) 9,5 i c) 10,0. Između prikazanih spektralnih profila postoji izvesna razlika što ukazuje na zavisnost procesa autooksidacije etil-galata od pH vrednosti rastvora. Razlika se ogleda, pre svega, u brzini samog procesa, dok su izgled spektara, kao i spektralne promene gotovo identični za sve autooksidacione procese na navedenim pH vrednostima.



Slika 4.55. UV-Vis spektri snimljeni u toku procesa autooksidacije etil-galata (C(EG) = 300 μmol dm^{-3}): a) pH 9,0; vremenski interval snimanja 5 minuta; b) pH 9,5; vremenski interval snimanja 1 minut; c) pH 10,0; vremenski interval snimanja 1 minut.

Analiza spektara pokazuje konstatno smanjenje apsorpcionih maksimuma etil-galata na oko 235 nm i 320 nm. U oblasti od 350 nm do 450 nm dolazi do konstantnog porasta apsorbance sa formiranjem pregiba na oko 370 nm. Tokom pocesa pojavljuju se novi maksimumi na oko 250 nm i oko 275 nm. Uočava se pojava dve jasno definisane izobestičke tačke na talasnim dužinama od 295 nm i 340 nm. Treća izobestička tačka nije jasno definisana kao predhodno navedene dve i nalazi se na oko 240 nm.

Grafička analiza matričnom metodom pokazala je da se u toku autooksidacije etil-galata na pH vredonstima od 9,0; 9,5 i 10,0 nalaze dve čestice u ravnoteži.

Radi detaljnije analize procesa primenjena je MCR-ALS metoda. Prvi korak bilo je konstruisanje matrica ***D*** po principima navedenim u Poglavlju 2.4.1.2. Tabela 4.10. prikazuje jedinstvene vrednosti dobijene primenom SVD za autooksidacione procese na pH vredonstima od 9,0; 9,5 i 10,0. Podaci za jedinstvene vrednosti za navedene procese pokazuju da ovi procesi prate jednostavan mehanizam sa dve apsorbujuće čestice i zbog toga su u matricama $\boldsymbol{D}_{EG9.0}$, $\boldsymbol{D}_{EG9.5}$, $\boldsymbol{D}_{EG10.0}$ značajne tri svojstvene vrednosti.

Tabela 4.10. Analiza ranga matrica $\boldsymbol{D}_{EG9.0}$, $\boldsymbol{D}_{EG9.5}$, $\boldsymbol{D}_{EG10.0}$ (prikazano je prvih pet jedinstvenih vrednosti).

Faktori	pH 9,5	pH 10,0	pH 10,5
1	33,6048	41,1455	18,9801
2	7,20936	8,27008	3,47568
3	0,375607	0,245411	0,0418612
4	0,031634	0,127428	0,0287449
5	0,0285727	0,0326068	0,0272911

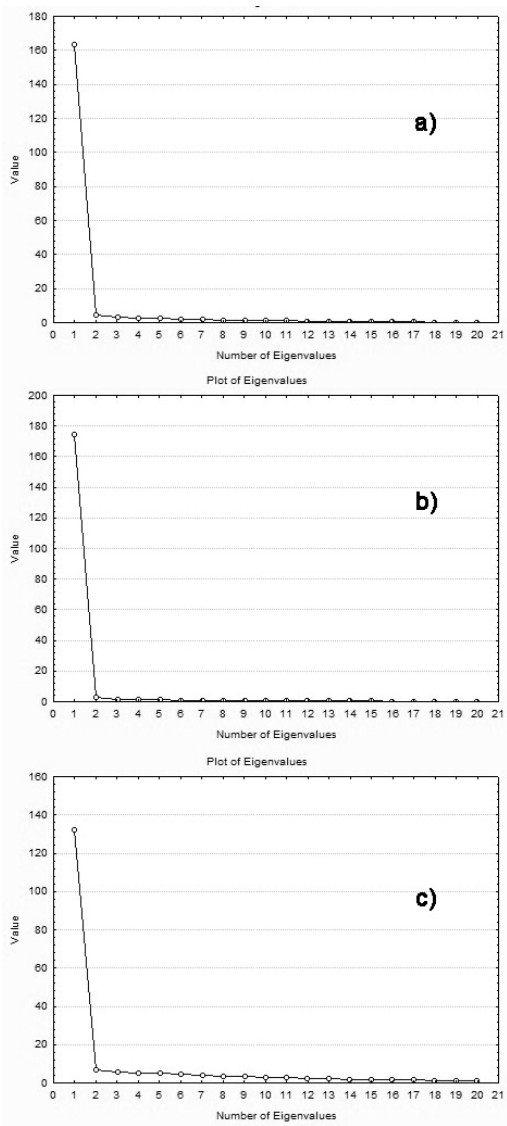
Za procenu ranga matrica apsorbancija primenjen je *scree* grafički prikaz u faktorskoj analizi (FA). Slika 4.56. prikazuje FA *scree* grafički prikaz za proces autooksidacije etil-galata u vodenom rastvoru na pH vredonstima 9,0; 9,5 i 10,0.

Rezultati prikazani na Slici 4.56. pokazuju da je za procese autooksidacije etil-galata na pH vrednostima 9,0; 9,5 i 10,0 rang apsorpcione matrice dva. U skladu sa dobijenim rezultatima broj jedinstvenih vrednosti je dva za sva tri procesa.

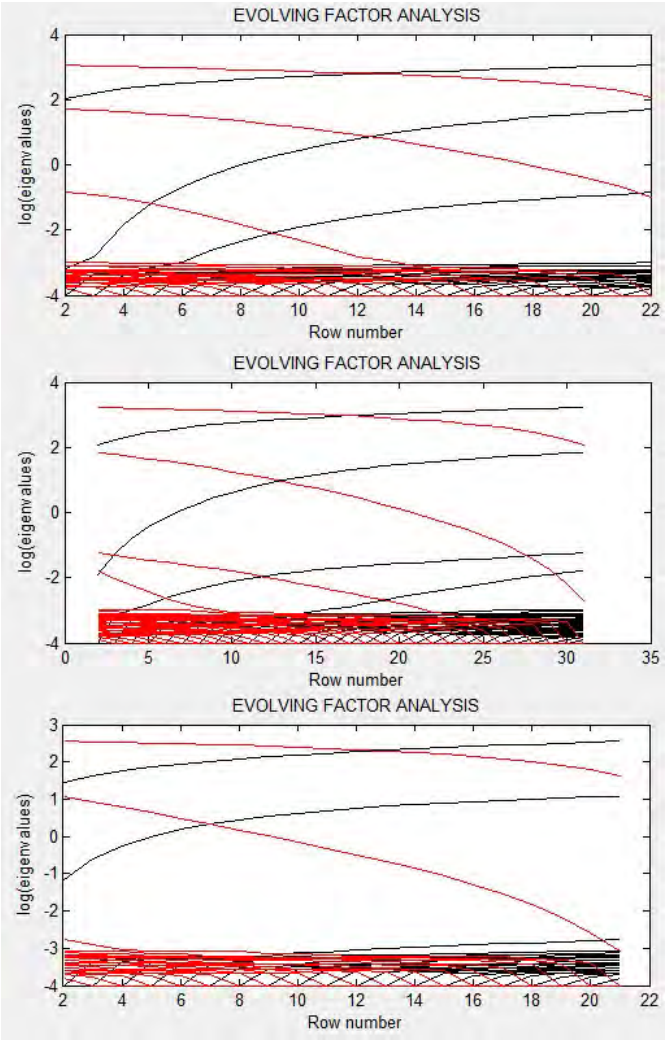
Slika 4.57. prikazuje EFA grafički prikaz za proces autooksidacije etil-galata na pH vredonstima 9,0; 9,5 i 10,0. Analiza unapred podataka za sve procese pokazuje da se promene spektralnih podataka od samog početka autooksidacije mogu objasniti preko dva faktora.

Prisustvo dva faktora od samog početka reakcije može se povezati sa prisustvom dve komponente u reakciji u kojoj dolazi do autooksidacije etil-galata. Iste informacije se dobijaju i pomoću analize unazad matrica $\boldsymbol{D}_{EG9.0}$, $\boldsymbol{D}_{EG9.5}$ i $\boldsymbol{D}_{EG10.0}$.

Rezultati dobijeni iz *scree* grafičkog prikaza (*eigenvalues*) u FA analizi i EFA grafičke analize (*log of eigenvalues* korišćen u ALS) su identični i iznose dva. Informacije o jedinjenjima koja su uključena u proces autooksidacije se mogu dobiti primenom MCR-ALS analize matrica $\boldsymbol{D}_{EG9.0}$, $\boldsymbol{D}_{EG9.5}$ i $\boldsymbol{D}_{EG10.0}$.



Slika 4.56. *Scree* grafički prikaz u faktorskoj analizi (FA) za proces autooksidacije etil-galata na pH a) 9,0; b) 9,5 i c) 10,0.



Slika 4.57. EFA grafički prikaz matrica spektralnih podaka ($\boldsymbol{D}_{EG9.0}$ gore, $\boldsymbol{D}_{EG9.5}$ sredina, $\boldsymbol{D}_{GA10.0}$ dole). Pravci analize: unapred (crne linije) i unazad (crvene linije).

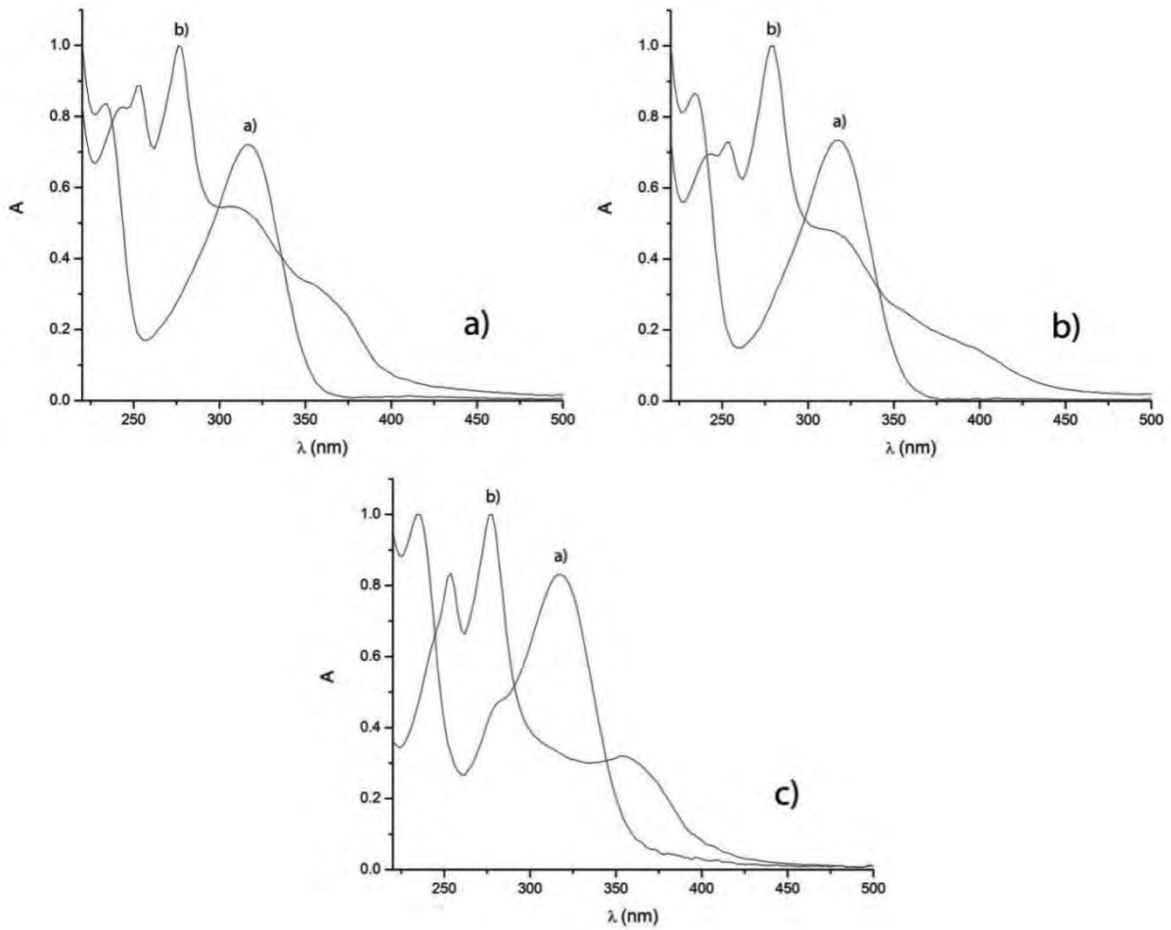
Eksperimentalni podaci su obrađeni korišćenjem *soft* MCR-ALS metode uz primenu uslova ne-negativnosti (za koncentraciju i spektre) i jednoznačnosti (za koncentracione profile).Primena MCR-ALS metode je ukazala na prisustvo dve apsorbujuće čestice za autooksidacione procese na navedenim pH vredostima. LOF% za sva tri procesa je bio niži od 1%. Tabela 4.11. prikazuje procenu kvaliteta razdvajanja korišćenem standardne devijacije ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke, greške fitovanja i objašnjene varijance.

Tabela 4.11. Kvalitet razdvajanja procenjen korišćenjem standardne devijacije ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke, LOF% i objašnjene varijanse

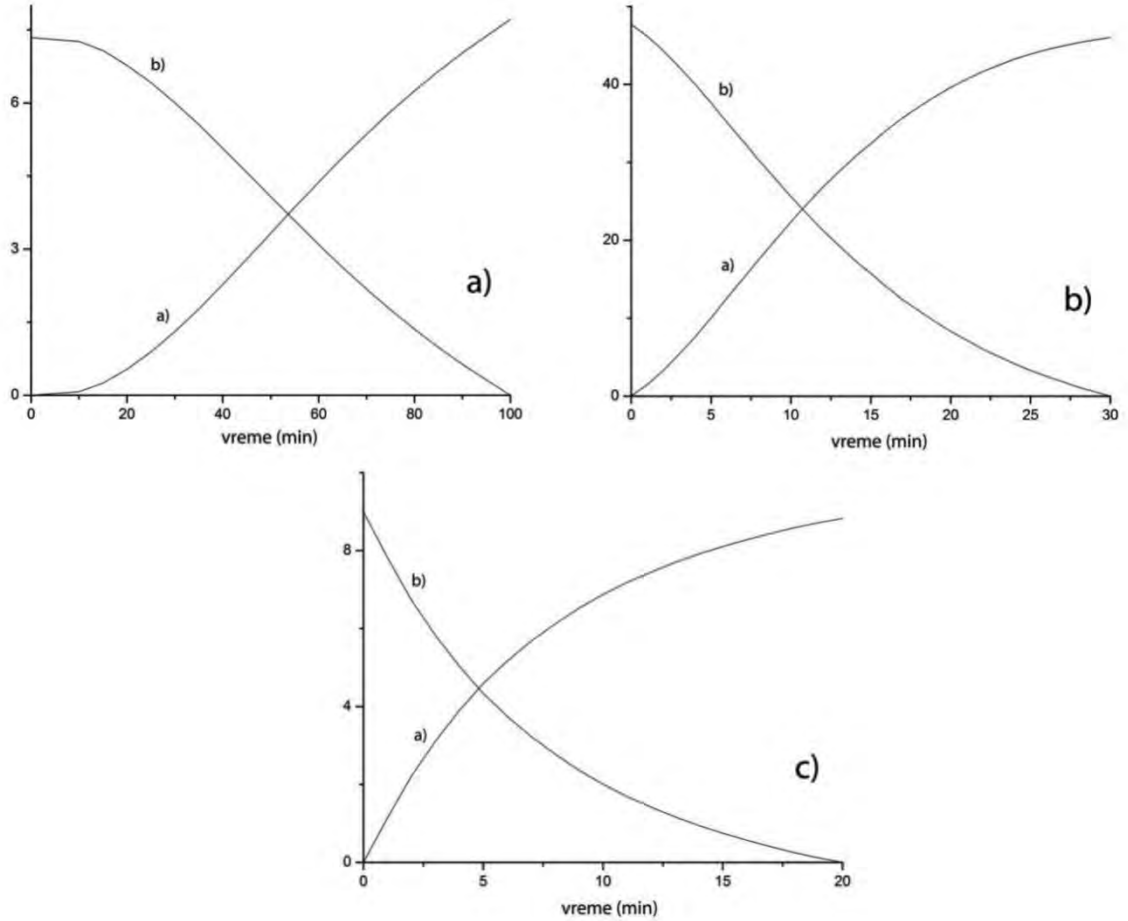
	pH 9,0	pH 9,5	pH 10,0
SdRex	0,0059641	0,0038687	0,001523
LOF% (PCA)	$9{,}9588\times10^{-5}$	0,0026824	$3{,}4307 \times 10^{-5}$
LOF% (exp)	1,1248	0,70929	0,49987
r^2	99,9873	99,995	99,9975

SdRex – standardna devijacija ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke
LOF% – *lack-of-fit* za PCA i eksperiment
r^2 – procenat objašnjene varijance

Slika 4.58. prikazuje odgovarajuće spektre pojedinačnih komponenti ($\boldsymbol{S}^{\mathbf{T}}$) za sva tri procesa, dok slika 4.59. prikazuje izračunate koncentracione profile ($\boldsymbol{C}$) jedinjenja koja učestvuju u procesu autooksidacije.

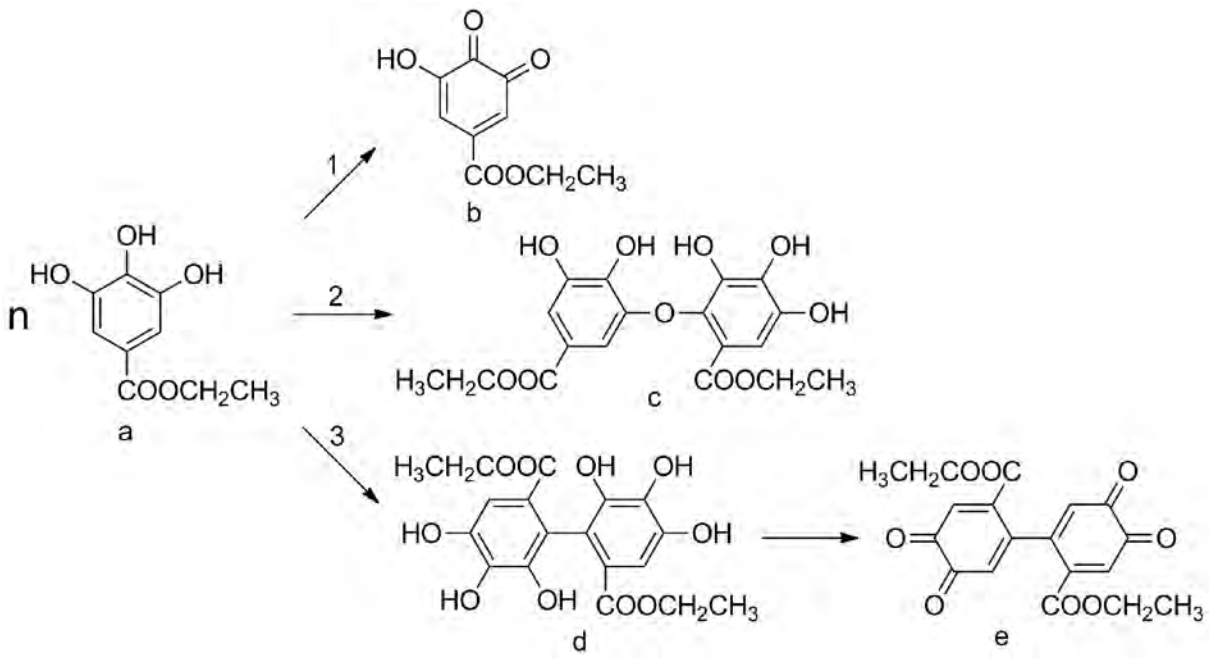


Slika 4.58. Spektri čistih komponenti ($\boldsymbol{S}^{\mathbf{T}}$) (a) etil-galat, b) proizvod autooksidacije) dobijeni MCR-ALS metodom: a) pH 9,0; b) pH 9,5; c) pH 10,0.



Slika 4.59. Koncentracioni profili (***C***) apsorbujućih čestica (a) etil-galat, b) proizvod autooksidacije) u toku procesa autooksidacije etil-galata: a) pH 9,0; b) pH 9,5; c) pH 10,0.

U sva tri analizirana procesa autooksidacije etil-galata detektovan je samo jedan autooksidacioni proizvod, a prema spektralnim karakteristikama može se pretpostaviti da je taj proizvod identičan za sva tri procesa. Mogući mehanizmi autooksidacije etil-galata su prikazani u šemi 4.7.



Šema 4.7. Mogući mehanizmi autooksidacije etil-galata.

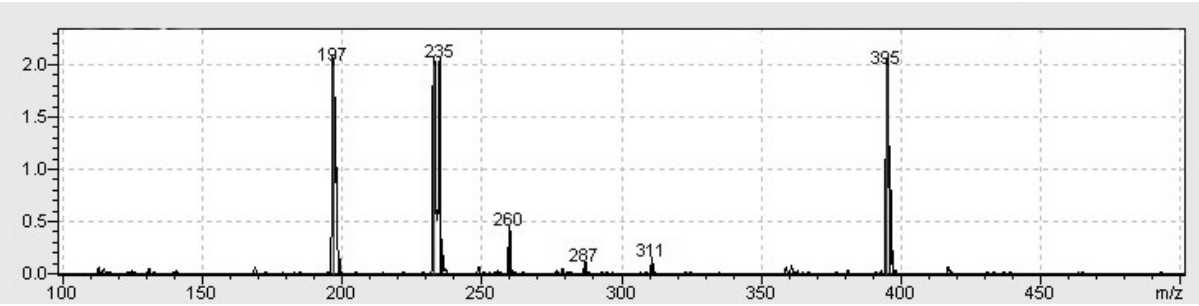
Mehanizam pod brojem 1 je najjednostavnija autooksidacija etil-galata (a) do odgovarajućeg hinona (b). Reakcija pod brojem 2 je proces koji prikazuje građenje C-O dimera (c). Mehanizam pod brojem 3 prikazuje reakciju građenja C-C dimera (d) i dalju oksidaciju dimera do odgovarajućeg hinonskog molekula (e). Za razlku od pirogalola kod koga je moguće građenje C-O i C-C dimera vezivanjem dva molekula pirogalola u *orto* i *para* položajima u odnosu na krajnju hidroksiksilnu grupu, kod etil-galata, kao i kod galne kiseline *para* položaj je blokiran, što ostavlja mogućnost građenja samo *orto* dimera. Takođe, za razliku od galne kiseline gde je postojala mogućnost građenja intramolekulske estarske veze (kao kod elaginske kiseline), kod etil-galata to nije moguće jer je već nagrađen etil estar. Spektri čistih komponenti dobijeni MCR-ALS metodom pokazuju postojanje samo jednog proizvoda autooksidacije što dovodi do pretpostavke da u opsegu pH vredonsti 9,0-10,0, autooksidacioni proizvod ne zavisi od pH sredine. Ovo se može povezati sa činjenicom da je u datom opsegu pH vrednosti disosovana samo jedna od hidroksilnih grupa.

Razlika između procesa je u brzini autooksidacije etil-galata pri različitim pH vrednostima. Ako se analiziraju koncentracioni profili ***C*** dobijeni primenom MCR-ALS metode može se uočiti da koncentracija etil-galata (supstanca a) konstantno opada tokom celog procesa, dok koncentracija proizvoda autooksidacije (supstanca b) konstantno raste. Vremenska tačka kada se ove dve krive seku može biti iskorišćena kao gruba procena brzine procesa. Za proces na pH 9,0 to je oko 45 minuta, za pH 9,5 oko 10 minuta, a za pH 10,5 oko 5 minuta. I u slučaju

etil-galata, kao i kod galne kiseline, procesi autooksidacije su reakcije prvog reda, ali ako se uporede razlike u brzini procesa sa povećanjem pH kod galne kiseline i etil-galata može se uočiti da je kod etil-galata ta razlika znatno veća u odnosu na procese kod galne kiseline. Razlog najverovatnije leži u činjenici da je kod galne kiseline disosovana i karboksilna i jedna hidroksilna grupa, a kod etil-galata samo jedna hidroksilna grupa. Karboksilna grupa je znatno kiselija u odnosu na hidroksilnu i najverovatnije njeno negativno naelektrisanje dodatno stabilizuje nastali radikal iz galne kiseline. Povećanjem pH povećava se i broj hidroksilnih grupa koje disosuju i koje mogu da učestvuju u slobodno radikalskim reakcijama. Međutim, njihov ukupni doprinos je manji nego doprinos karboksilne grupe, pa se samim tim sa povećanjem pH vrednosti brzina autooksidacije galne kiseline malo povećava. U slučaju etil-galata samo naelektrisanje na hidroksilnoj grupi doprinosi stabinosti radikala i zato je reaktivnost radikala koji nastaje iz etil-galata veća. Kako je broj disosovanih hidroksilnih grupa u direktnoj zavisnosti od pH, tako se i sa povećanjem pH vrednosti sredine, znatno povećava i brzina autooksidacije. Tačna vrednost konstante brzine reakcije se ne može dobiti primenom *soft* MCR-ALS metode. Takođe se ne može isključiti postojanje smeše proizvoda koja se ovom metodom identifikuje kao jedna komponenta.

4.3.1.2. ESI-MS analiza

Na slici 4.60. prikazan je maseni spektar etil-galata u vodenom rastvoru na pH 7,0 odmah nakon pripreme.

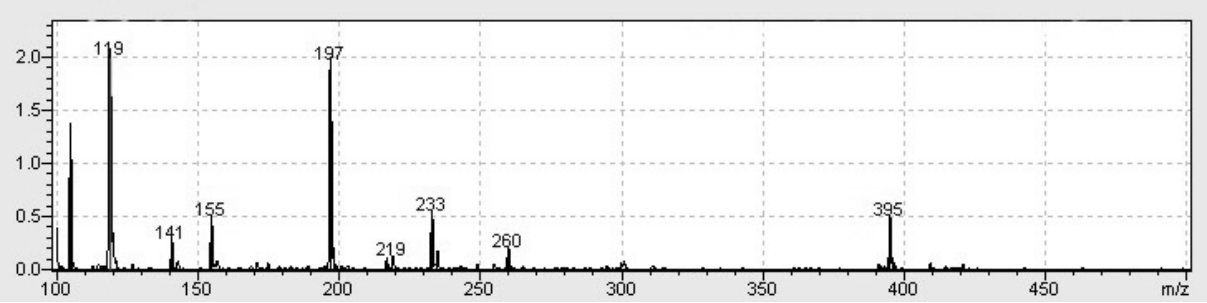


Slika 4.60. ESI-MS spektar vodenog rastvora etil-galata na pH 7,0. Vreme autooksidacije 0 min.

U ESI-MS spektru etil-galata pre početka autooksidacije pojavljuje se veći broj jona, a dva najkarakterističnija su joni sa m/z vrednostima 197 i 395. Jon na m/z vrednosti 197 je molekulski $[EG - H]^-$ jon etil-galata nastao odlaskom H^+ jona iz molekula etil-galata, dok je jon na m/z vrednosti 395 najverovatnije $[2EG - H]^-$ jon u kome su dva molekula etil-galata

povezana sa dve vodonične veze. Zbog relativno visoke koncentracije etil-galata u rastvoru može se očekivati građenje adukata (asocijata) između molekula etil-galata međusobno ili sa molekulima rastvarača u većem obimu. Tako bi, na primer, jon na m/z vrednosti 233 mogao bi da bude dvostruko hidratisani $[EG+2H_2O - H]^-$ jon. Jon na m/z vrednosti 260 bi mogao da bude dvostruko negativno naelektrisani jon složene strukture $[2EG+PG - 2H]^{2-}$ ukoliko se pretpostavi da u jonizacionoj komori dolazi do fragmentacije etil-galata i formiranja pirogalola koji bi gradio adukt sa dva molekula etil-galata.

Na slici 4.61. prikazan je maseni spektar etil-galata u vodenom rastvoru na pH 8,5 nakon četri sata autooksidacije.



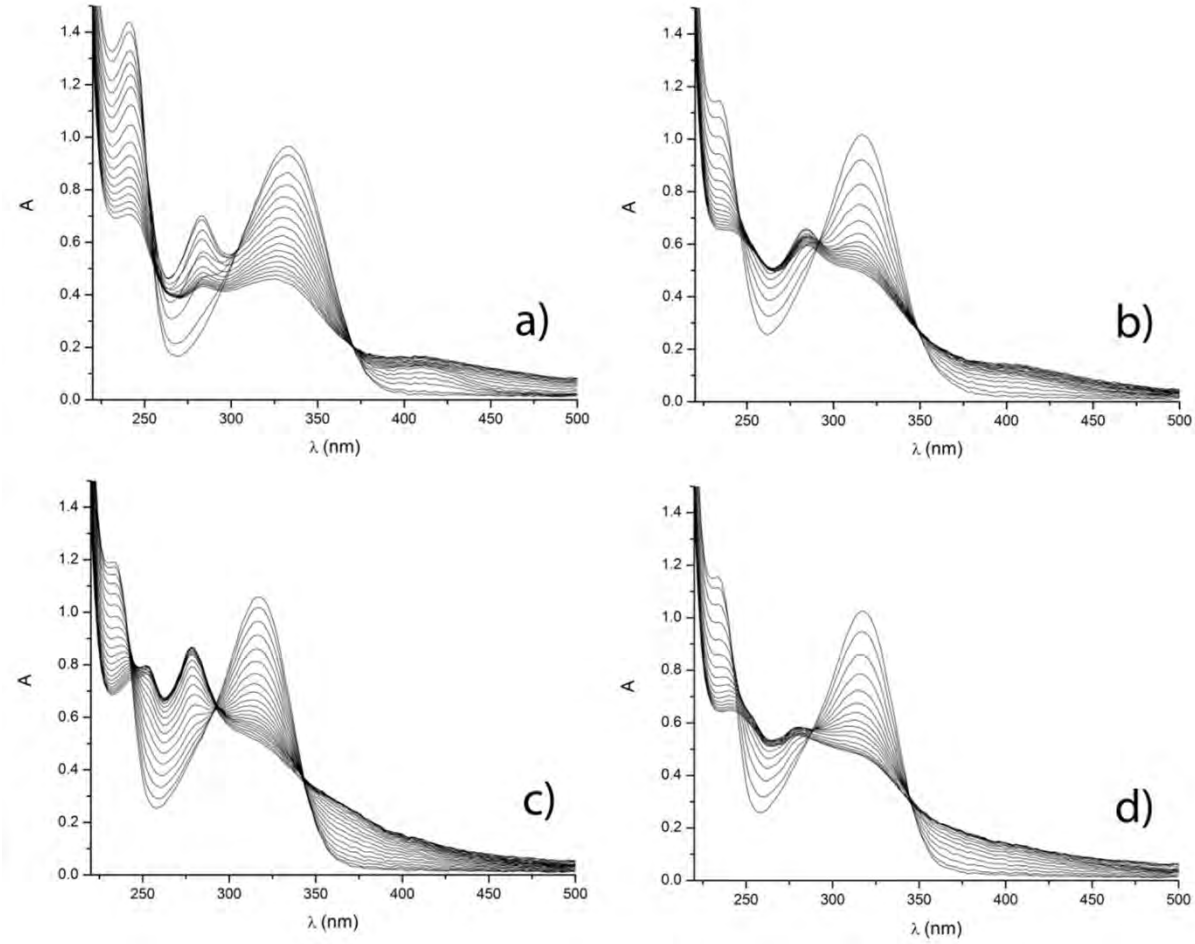
Slika 4.61. ESI-MS spektar vodenog rastvora etil-galata na pH 8,5. Vreme autooksidacije 4 h.

U spektru prikazanom na slici 4.61. javljaju se signali jona sa m/z vrednostima 197, 233, 260 i 395 kao i u spektru samog etil-galata pre početka autooksidacije (slika 4.60.), ali je najintezivnijiji signal koji potiče od jona čija je m/z vrednost 119. Prisustvo ovog jona i jona čija je m/z vrednost 105 uočeno je i u ESI-MS spektru pirogalola nakon autooksidacije i može se objasniti raskidanjem veza u prstenu i formiranjem istih degradacionih proizvoda kao i kod pirogalola, što je prikazano na šemi 4.3. Signali koji potiču od jona sa m/z vrednostima 141 i 155 se takođe javljaju i u ESI-MS spektru pirogalola nakon autooksidacije i njihovo nastajanje se može objasniti na analogan način (šema 4.4.) uz pretpostavku da je u jonizacionoj komori došlo do fragmentacije etil-galata i formiranja pirogalola.

4.3.2. Autooksidacija etil-galata u prisustvu dvovalentnih dijamagnetnih jona zemnoalkalnih metala

4.3.2.1. UV/Vis spektralna analiza

Na Slici 4.62. su prikazani UV/Vis spektri snimljeni u toku autooksidacije etil-galata u vodenom rastvoru na pH 7,4 (fiziološka pH vrednost) u prisustvu dvovalentnih dijamagnetnih metalnih jona: a) Mg(II), b) Ca(II), c) Sr(II) i d) Ba(II). Različiti spektralni profili koji se mogu uočiti u ova četri slučaja potvrđuju zavisnost autooksidacije etil-galata od vrste metalnog jona.



Slika 4.62. UV/Vis spektri snimljeni u toku procesa autooksidacije etil-galata (C(EG) = 300 μmol dm^{-3}, pH 7,4; C(M(II)) = 0,1 mol dm^{-3}) u prisustvu a) Mg(II) jona, vremenski interval snimanja 1 minut, b) Ca(II), c) Sr(II) i d) Ba(II) jona, vremenski interval snimanja 5 minuta.

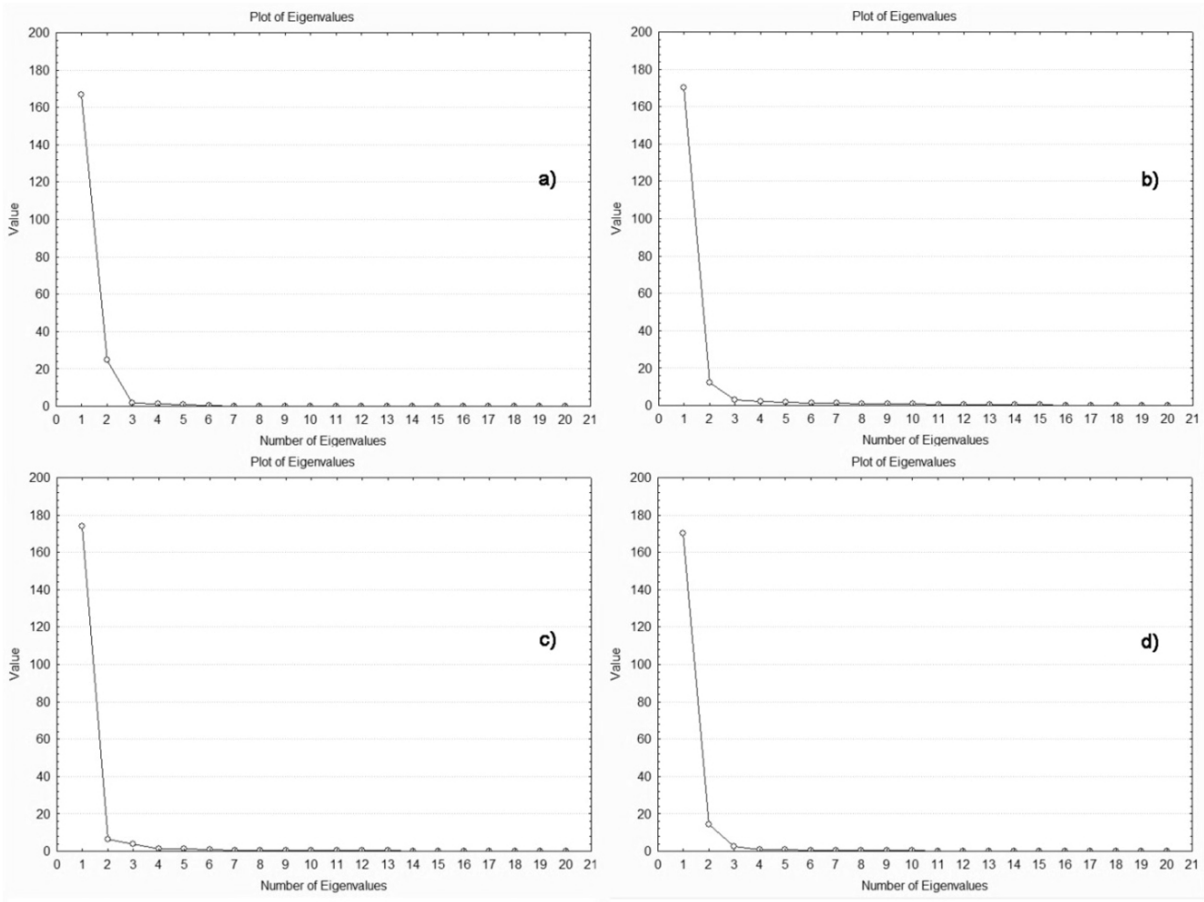
Vizuelno poređenje dobijenih spektara pokazuje da intenziteti apsorpcionih maksimuma etil-galata na oko 240 i 320 nm (odnosno 330 nm u prisustvu Mg(II) jona) konstantno opadaju tokom procesa autooksidacije. U toku procesa se javlja novi apsorpcioni maksimum na oko 280 nm čiji intezitet zavisi od toga koji jon je prisutan u sistemu. U sistemima gde su prisutni Mg(II) i Ca(II) joni uočava se pojava novog širokog apsorpcionog maksimuma na oko 410 nm. U prisutvu Sr(II) i Ba(II) navedeni maksimum se ne uočava već se javlja povećanje apsopcije u celoj vidljivoj oblasti, ali se javlja izražen porast apsorpcije na oko 255 nm (u sistemu sa Sr(II) jonima se čak može okarakterisati kao novi apsorpcioni maksimum). Uočava se pojava jasno definisane izobestičke tačke na oko 350 nm.

Radi dalje analize procesa primenjena je MCR-ALS metoda. Prvi korak bilo je konstruisanje matrica $\boldsymbol{D}$ po principima definisanim u Poglavlju 2.4.1.2. Sledeći korak bilo je određivanje jedinstvenih vrednosti primenom SVD. Tabela 4.12. prikazuje jedinstvene vrednosti dobijene primenom SVD za procese autooksidacije etil-galata u prisustvu Mg(II), Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona. Podaci za jedinstvene vrednosti za procese u prisustvu Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona na pH 7,4 pokazuju da ovi procesi prate jednostavan mehanizam sa dve apsorbujuće čestice. Iz tog razloga su dve svojstvene vrednosti značajne u matricama $\boldsymbol{D}_{EG\text{-}Ca}$, $\boldsymbol{D}_{EG\text{-}Sr}$ i $\boldsymbol{D}_{EG\text{-}Ba}$. Podaci iz Tabele 4.12. pokazuju da su kod procesa autooksidacije etil-galata na pH 7,4 u prisustvu Mg(II) jona za matricu $\boldsymbol{D}_{EG\text{-}Mg}$ značajne tri svojstvene vrednosti.

Tabela 4.12. Analiza ranga matrica $\boldsymbol{D}_{EG\text{-}Mg}$, $\boldsymbol{D}_{EG\text{-}Ca}$, $\boldsymbol{D}_{EG\text{-}Sr}$ i $\boldsymbol{D}_{EG\text{-}Ba}$ (prikazano je prvih pet jedinstvenih vrednosti).

Faktori	Mg	Ca	Sr	Ba
1	35,441	32,5507	26,8183	21,371
2	3,7211	2,9655	4,84126	3,06789
3	1,53177	0,618064	0,46184	0,391299
4	0,712343	0,352886	0,20794	0,21842
5	0,529392	0,323013	0,3958	0,03468

Za procenu ranga matrica apsorbancija primenjen je *scree* grafički prikaz u faktorskoj analizi (FA). Slika 4.63. prikazuje *scree* grafički prikaz za FA procesa autooksidacije etil-galata u prisustvu Mg(II), Ca(II), Sr(II) i Ba (II) jona.

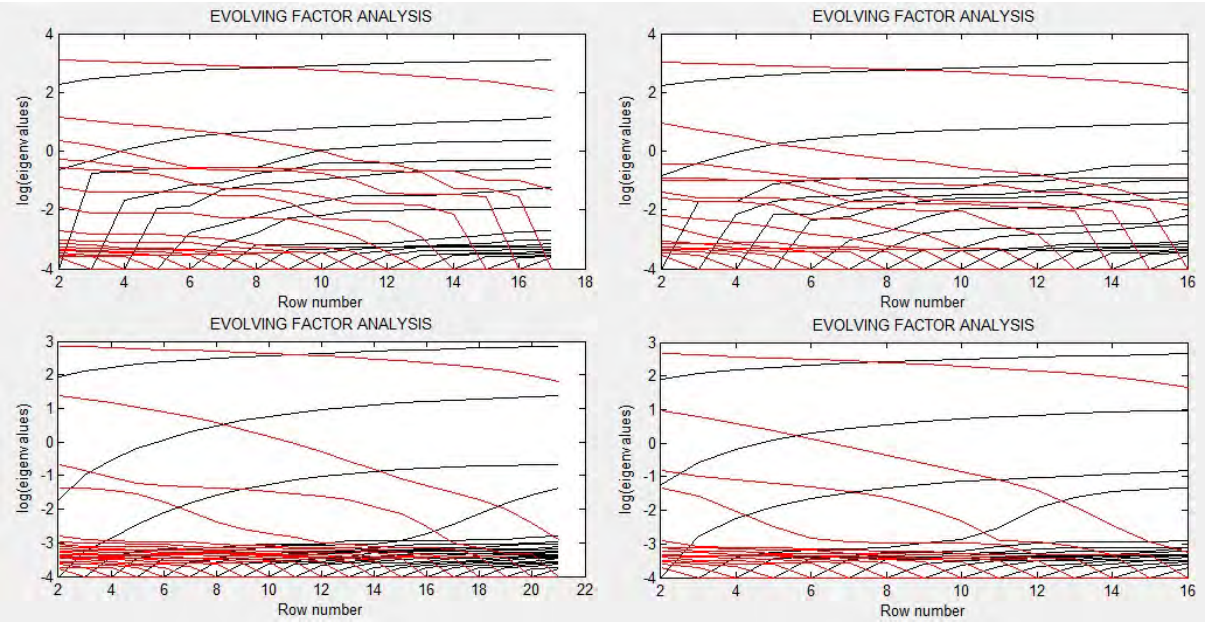


Slika 4.63. *Scree* grafički prikaz u faktorskoj analizi (FA) za procese autooksidacije etil-galata na pH 7,4 u prisustvu a) Mg(II), b) Ca(II), c) Sr(II) i d) Ba(II) jona.

Rezultati prikazani na Slici 4.63. pokazuju da je za proces autooksidacije etil-galata na pH 7,4 u prisustvu Mg(II) jona rang apsorpcione matrice 3, a za procese na pH 7,4 u prisustvu Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona rang apsorpcione matrice je 2. U skladu sa dobijenim rezultatima broj svojstvenih vrednosti je tri za proces na pH 7,4 u prisustvu Mg(II) jona i dva za procese u prisustvu Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona.

Slika 4.64. prikazuje EFA grafički prikaz za procese autooksidacije etil-galata u prisustvu Mg(II), Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona. Analiza unapred podataka za procese autooksidacije na pH 7,4 u prisustvu Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona pokazuje da se promene spektralnih podataka od samog početka autooksidacije mogu objasniti preko dva faktora. Prisustvo dva faktora od samog početka reakcije može se povezati sa prisustvom dva jedinjenja u reakciji u kojoj dolazi do autooksidacije etil-galata. U slučaju matrice $\boldsymbol{D_{EG\text{-}Mg}}$ nakon 15-20 minuta od početka reakcije novi faktor postaje relevantan, ukazujući da se pojavila nova komponetna koja apsorbuje u UV/Vis oblasti. Nakon 45 minuta od početka reakcije broj značajnih faktora je

identičan kao i na početku reakcije. Iste informacije se dobijaju i pomoću analize unazad matrica $\boldsymbol{D_{EG\text{-}Mg}}$, $\boldsymbol{D_{EG\text{-}Ca}}$, $\boldsymbol{D_{EG\text{-}Sr}}$ i $\boldsymbol{D_{EG\text{-}Ba}}$.



Slika 4.64. EFA grafički prikaz matrica spektralnih podaka ($\boldsymbol{D_{EG\text{-}Mg}}$ gore levo, $\boldsymbol{D_{EG\text{-}Ca}}$ gore desno, $\boldsymbol{D_{EG\text{-}Sr}}$ dole levo, $\boldsymbol{D_{EG\text{-}Ba}}$ dole desno). Pravci analize: unapred (crne linije) i unazad (crvene linije).

EFA analiza unapred i unazad matrice $\boldsymbol{D_{EG\text{-}Mg}}$ pokazuje prisustvo tri značajna faktora.

Rezultati dobijeni iz *scree* grafičkog prikaza (*eigenvalues*) u FA analizi i EFA grafičkog prikaza (*log of eigenvalues* korišćen u ALS) su identični i iznose dva, odnosno tri. Detaljnije informacije o jedinjenjima koja su uključena u proces autooksidacije etil-galata se mogu dobiti primenom MCR-ALS analize matrica $\boldsymbol{D_{EG\text{-}Mg}}$, $\boldsymbol{D_{EG\text{-}Ca}}$, $\boldsymbol{D_{EG\text{-}Sr}}$ i $\boldsymbol{D_{EG\text{-}Ba}}$.

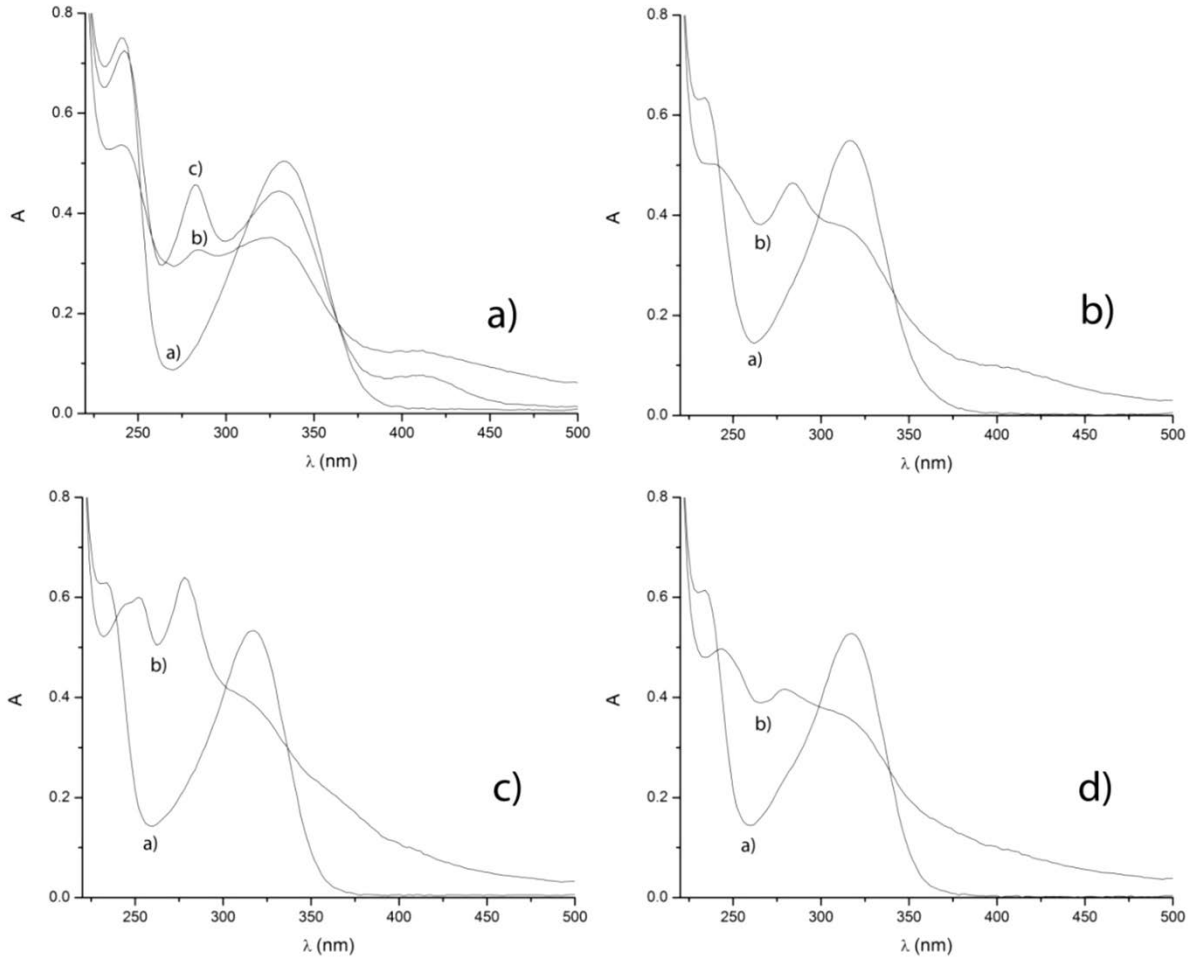
Eksperimentalni podaci su obrađeni korišćenjem *soft* MCR-ALS metode uz primenu uslova ne-negativnosti (za koncentraciju i spektre) i jednoznačnosti (za koncentracione profile). Primenom MCR-ALS metode utvrđeno je prisustvo tri čestice za autooksidacioni proces u prisustvu Mg(II) jona i dve čestice za autooksidacione procese u prisustvu Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona. LOF% za sva četri procesa je bio niži od 1%. Tabela 4.13. prikazuje procenu kvaliteta razdvajanja korišćenjem standardne devijacije ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke, greške fitovanja i objašnjene varijance.

Tabela 4.13. Procena kvaliteta razdvajanja korišćenjem standardne devijacije ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke, LOF% i objašnjene varijance.

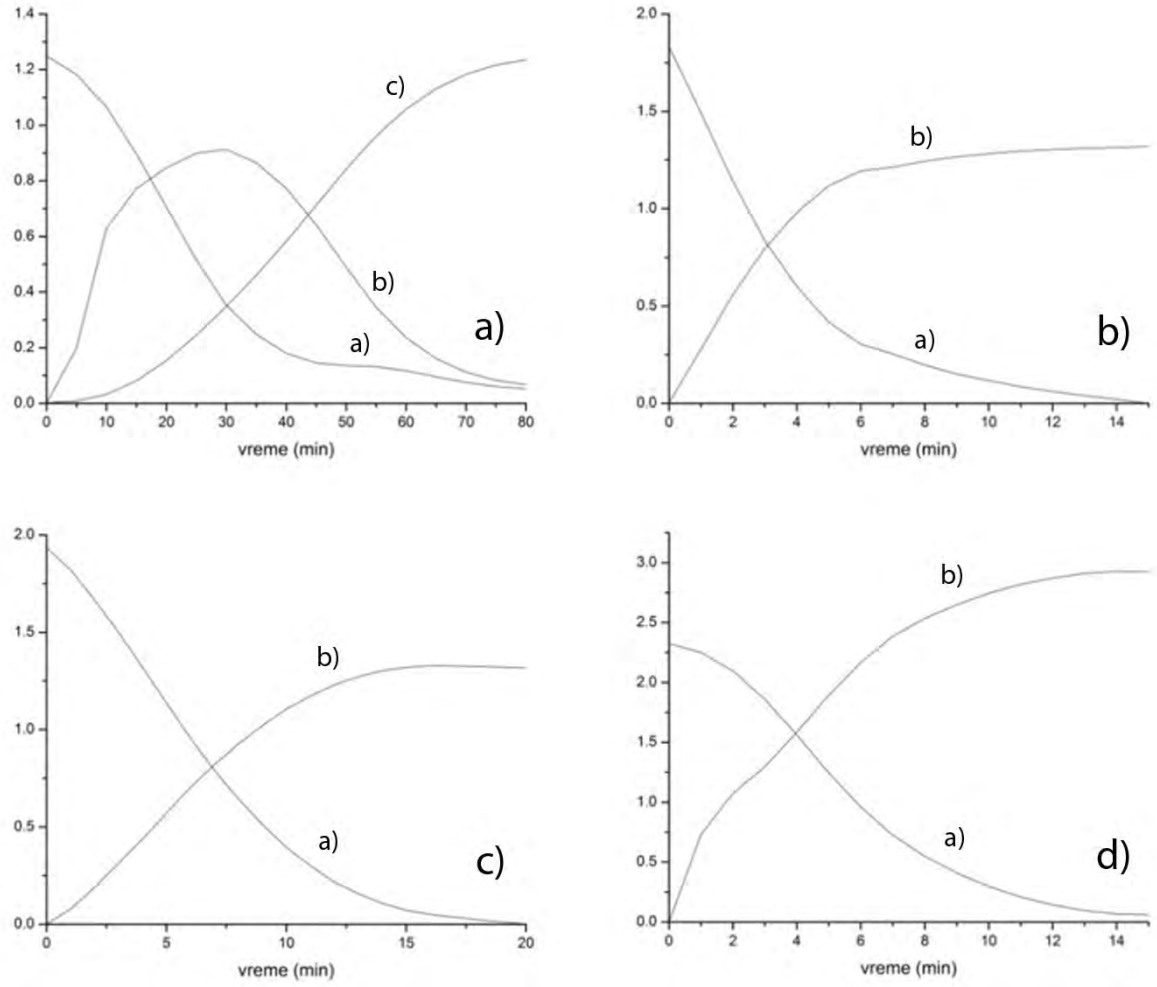
	Mg	Ca	Sr	Ba
SdRex	0,0161	0,01485	0.0081368	0,008229
LOF% (PCA)	0,0019914	$9{,}9341\times10^{-13}$	$2{,}2265\times10^{-6}$	$9{,}5811\times10^{-11}$
LOF% (exp)	2,6046	2,5435	1,8906	2,1066
r^2	99,9322	99,9353	99,964	99,9556

SdRex – standardna devijacija ostataka u odnosu na eksperimentalne podatke
LOF% – *lack-of-fit* za PCA i eksperiment
r^2 – procenat objašnjene varijance

Slika 4.65. prikazuje odgovarajuće spektre pojedinačnih komponenti ($\boldsymbol{S}^{\mathbf{T}}$) za sva četiri procesa, dok slika 4.66. prikazuje izračunate koncentracione profile ($\boldsymbol{C}$) pojedinačnih komponenti u procesima autooksidacije etil-galata u prisustvu Mg(II), Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona.



Slika 4.65. Spektri pojedinačnih komponenti ($\boldsymbol{S}^{\mathbf{T}}$) dobijeni MCR-ALS metodom za procese autooksidacije etil-galata u prisustvu: a) Mg(II), b) Ca(II), c) Sr(II) i d) Ba(II) jona.



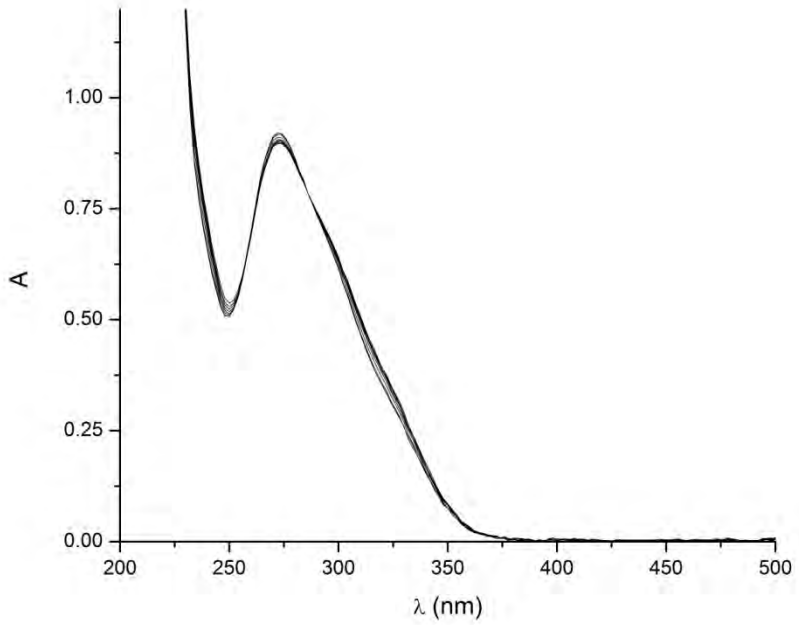
Slika 4.66. Kinetički profili (***C***) dobijeni MCR-ALS metodom za autooksidaciju etil-galata na pH 7,4 u prisustvu: a) Mg(II), b) Ca(II), c) Sr(II) i d) Ba(II) jona.

U autooksidacionim procesima etil-galata u prisustvu jona Ca(II), Sr(II) i Ba(II) identifikovani proizvodi autooksidacije imaju praktično identične spektralne karakteristike. U toku celokupnog vremenskog intervala u kome su snimani UV/Vis spektri dolazi do konstantnog opadanja koncentracije etil-galata (jedinjenje a)) i povećanja koncentracije proizvoda autooksidacije (jedinjenja b)). Ako se uporede koncentracioni profili supstanci a) i b) može se uočiti da postoji razlika u brzini opadanja koncentracije supstance a) i povećanja koncentracije supstance b) u zavisnosti od toga koji je od M(II) jona zemnoalkalnih metala prisutan u rastvoru. Vreme kada se koncentracione krive supstanci a) i b) seku može da posluži za procenu brzine samog procesa U slučaju kada je u rastvoru prisutan Ca(II) jon to je oko 2,5 minuta, kod Sr(II) jona to je takođe oko 5,5, a kod Ba(II) jona oko 4 minuta. Kada je u sistemu prisutan Mg(II) jon proces autooksidacije se odigrava prema drugačijem

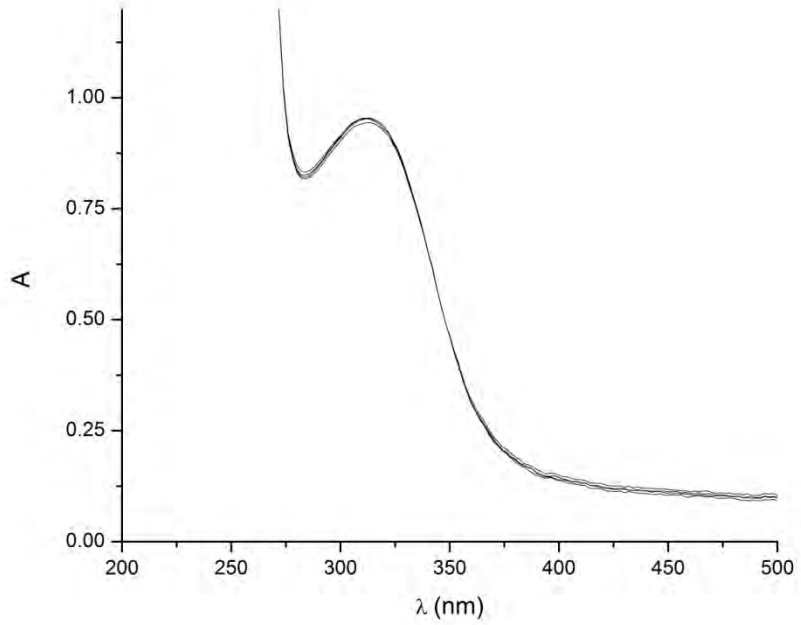
mehanizmu u kome je prisutan intermedijer. U toku procesa autooksidacije koncentracija etil-galata konstantno opada i za razliku od procesa autooksidacije u prisustvu Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona ne padne na nulu. Koncentracija proizvoda autooksidacije b) raste do 30 minuta i nakon toga počinje da opada. Proizvod c) se pojavljuje oko 5 minuta i njegova koncentracija raste do 70 minuta kada kriva zavisnosti koncentracije od vremena dobija plato.

4.3.3. Autooksidacija etil-galata u prisustvu Zn(II), Pb(II) i Cd(II) jona

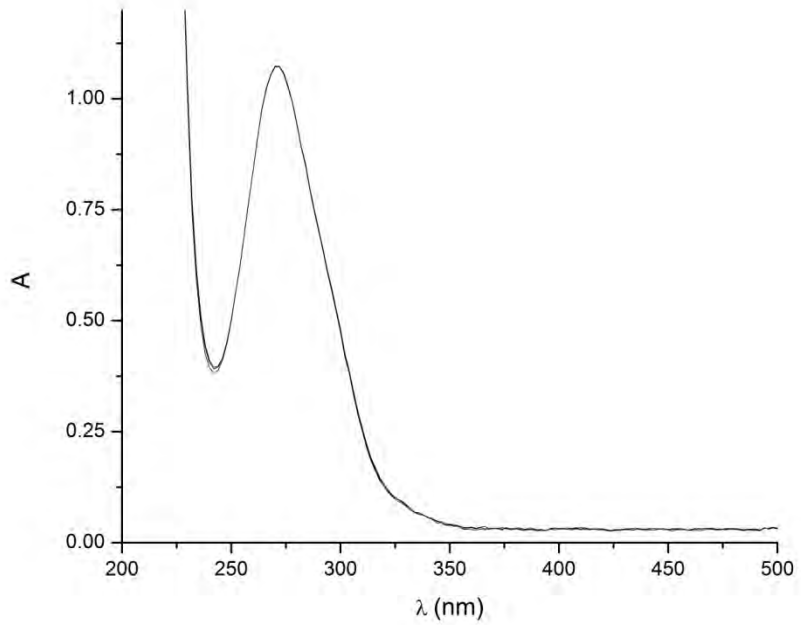
Proces autooksidacije etil-galata u prisustvu Zn(II), Pb(II) i Cd(II) jona (C(M(II) = 0,1 mol dm^{-3}) praćen je spektrofotometrijski na pH 5,5 u vremenu do 2 dana. UV/Vis spektri prikazani na slikama 4.67.; 4.68. i 4.69. ukazuju da pod navedenim uslovima nije došlo do autooksidacije etil-galata jer se praktično ne uočavaju nikakve promene spektara sa vremenom. Ovo je posledica, pre svega, niske pH vrednosti rastvora (pri višim pH vrednostima je jako izažena hidroliza ovih jona). Sami spektri etil-galata u prisustvu navedenih jona se ipak donekle razlikuju zbog razlika u fizičko-hemijskim karakteristikama ovih jona.



Slika 4.67. UV/Vis spektri snimljeni u toku procesa autooksidacije etil-galata (C(EG) = 300 μmol dm^{-3}, pH 5,5; interval snimanja 5 h) u prisustvu Zn(II) jona (C(Zn(II)) = 0,1 mol dm^{-3}).



Slika 4.68. UV/Vis spektri snimljeni u toku procesa autooksidacije etil-galata (C(EG) = 300 μmol dm^{-3}, pH 5,5; interval snimanja 5 h) u prisustvu Pb(II) jona (C(Pb(II)) = 0,1 mol dm^{-3}).



Slika 4.69. UV/Vis spektri snimljeni u toku procesa autooksidacije etil-galata (C(EG) = 300 μmol dm^{-3}, pH 5,5; interval snimanja 5 h) u prisustvu Cd(II) jona (C(Cd(II)) = 0,1 mol dm^{-3}).

5. Zaključak

U ovoj doktorskoj disertaciji izvršeno je ispitivanje uticaja dijamagnetnih metalnih jona (Mg(II), Ca(II), Sr(II), Ba(II), Zn(II), Cd(II) i Pb(II)) na procese autooksidacije vicinalnih trihidroksilnih fenolnih jedinjenja u vodenim rastvorima. Procesi autooksidacije pirogalola (najjednostavnije jedinjenje sa odogvarajućom strukturom), galne kiseline i etil-galata proučavani su primenom UV/Vis spektrofotometrije sa naknadnom hemometrijskom obradom podataka, tečne hromatografije visokog učinka (HPLC), masene spektrometrije (ESI-MS) i ESR spektroskopije.

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Utvrđeno je da pH vrednost rastvora i prisustvo i vrsta dijamagnetnih metalnih jona imaju veliki uticaj na brzinu i način odvijanja procesa autooksidacije ispitivanih jedinjenja.
- Snimanjem UV/Vis spektara ispitivanih sistema u toku procesa autooksidacije dobijeni su spektrofotometrijski podaci koji su naknadno obrađivani hemometrijskim tehnikama. Grafička matrična analiza korišćena je kao jednostavan test za utvrđivanje broja apsorbujućih čestica u toku procesa autooksidacije. Metoda MCR-ALS je korišćena za detaljniju analizu spektrofotometrijskih podataka i, osim što su njenom primenom potvrđeni rezultati u pogledu broja apsorbujućih čestica koji su dobijeni grafičkom matričnom metodom, pomoću nje su dobijeni spektri pojedinačnih komponenti koje se javljaju u procesu autooksidacije i njihovi koncentracioni profili. Analiza UV/Vis spektara pojedinačnih komponenti koji su dobijeni metodom MCR-ALS i njihovo poređenje sa literaturnim podacima za slične sisteme omogućilo je donošenje zaključaka o strukturi proizvoda autooksidacije ispitivanih jedinjenja.
- Spektrofotometrijsko ispitivanje procesa autooksidacije vicinalnih trihidroksilnih fenolnih jedinjenja u baznim vodenim rastvorima bez prisustva metalnih jona pokazalo je da se u toku autooksidacije formiraju proizvodi složenije strukture, najverovatnije tipa dimera ili polimera, jer se u njihovim UV/Vis spektrima dobijenim metodom MCR-ALS javlja izražena apsorpcija u oblasti većih talasnih dužina. Spektrofotometrijski podaci takođe pokazuju da se proces autooksidacije pirogalola odvija po mehanizmu koji je složeniji u odnosu na galnu kiselinu i etil-galat i u ovom sistemu je kao prelazni proizvod autooksidacije identifikovan purpurogalin.
- Kod sva tri jedinjenja koja su ispitivana u ovom radu povećanje pH vrednosti rastvora, čak i u malom intervalu, dovodi do ubrzavanja procesa autooksidacije. Pri

tome se kod pirogalola sa povećanjem pH vrednosti od 7,4 na 8,0 menja i mehanizam reakcije, dok je efekat ubrzavanja procesa autooksidacije bez promene mehanizma reakcije pri povećanju pH vrednosti rastvora za jednu jedinicu (od 9,5 na 10,5 kod galne kiseline i od 9,0 na 10,0 kod etil-galata) znatno izraženiji kod etil-galata nego kod galne kiseline

- Ispitivanje procesa autooksidacije pirogalola i galne kiseline u baznim vodenim rastvorima bez prisustva metalnih jona primenom metode HPLC dalo je rezultate koji su u velikoj meri saglasni sa rezultatima spektrofotometriskih ispitivanja, ali su dobijeni i dodatni podaci. U hromatogramu proizvoda produžene autooksidacije pirogalola koji je dobijen HPLC-DAD tehnikom detektovan je veći broj komponenti u odnosu na hromatogram dobijen primenom HPLC sa fluorescentnom detekcijom što ukazuje da u toku produžene autooksidacije pirogalola dolazi i do njegove razgradnje. U HPLC-DAD hromatogramu proizvoda autooksidacije galne kiseline na pH 10,0 je, osim jednog glavnog proizvoda autooksidacije koji po retencionom vremenu i UV/Vis spektru odgovara nekoj vrsti dimera galne kiseline, detektovana i vrlo niska koncentracija komponente koja po retencionom vremenu i UV/Vis spektru odgovara elaginskoj kiselini za koju postoje literaturni podaci da nastaje pri autooksidaciji galne kiseline u jako baznim vodenim rastvorima.
- Ispitivanje procesa autooksidacije vicinalnih trihidroksilnih fenolnih jedinjenja u baznim vodenim rastvorima bez prisustva metalnih jona primenom metode ESI-MS omogućilo je identifikaciju proizvoda koji nastaju produženom autooksidacijom ovih jedinjenja. Kod sva tri jedinjenja koja su ispitivana u ovom radu detektovani su isti degradacioni proizvodi koji po strukturi odgovaraju oksikiselinama koje nastaju raskidanjem veza u benzenovom prstenu uz simultanu reakciju formiranih fragmenata sa jonima i slobodnim radikalima koji su prisutni u rastvoru.
- Spektrofotometrijsko ispitivanje procesa autooksidacije vicinalnih trihidroksilnih fenolnih jedinjenja u slabo baznim vodenim rastvorima u prisustvu jona zemnoalkalnih metala (Mg(II), Ca(II), Sr(II) i Ba(II)) pokazalo je značajnu razliku u pogledu spektralnih karakteristika proizvoda autooksidacije dobijenih u prisustvu Mg(II) jona u odnosu na spektralne karakteristike proizvoda dobijenih u prisustvu Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona koji su međusobno veoma slični. Karakteristike procesa autooksidacije ispitivanih jedinjenja (spektri pojedinačnih komponenti i njihovi koncentracioni profili dobijeni MCR-ALS metodom) u prisustvu Mg(II) jona na pH

7,4 su sličnije procesima autooksidacije u vodenim rastvorima bez prisustva metalnih jona na višim pH vrednostima nego procesima autooksidacije u prisustvu ostalih jona zemnoalkalnih metala. Ovakav specifičan uticaj Mg(II) jona može se objasniti značajno manjim jonskim radijusom (i uz to značajno većim vrednostima elektronegativnosti i entalpije hidratacije) ovog jona u odnosu na ostale jone zemnoalkalnih metala. Uticaj razlike u fizičko-hemijskim karakteristikama Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona na procese autooksidacije ispitivanih fenolnih jedinjenja manifestuje se jedino preko razlike u brzini procesa u prisustvu različitih jona.

- Poređenjem koncentracionih profila apsorbujućih čestica dobijenih MCR-ALS metodom za proces autooksidacije pirogalola na pH 7,4 u rastvoru bez prisustva metalnih jona i za procese autooksidacije pirogalola na pH 7,4 u prisustvu jona zemnoalkalnih metala uočava se da prisustvo ovih jona u rastvoru značajno ubrzava proces autooksidacije pirogalola.
- Spektrofotometrijsko ispitivanje procesa autooksidacije vicinalnih trihidroksilnih fenolnih jedinjenja u slabo kiselim vodenim rastvorima u prisustvu Zn(II) jona pokazalo je da samo u slučaju pirogalola dolazi do autooksidacije dok se kod galne kiseline i etil-galata UV/Vis spektri ispitivanih sistema praktično ne menjaju sa vremenom. UV/Vis spektri proizvoda autooksidacije pirogalola u prisustvu Zn(II) jona na pH 5,5 i 6,5 slični su spektrima proizvoda autooksidacije pirogalola u prisustvu Ca(II), Sr(II) i Ba(II) jona na pH 7,4.
- Spektrofotometrijsko ispitivanje vicinalnih trihidroksilnih fenolnih jedinjenja u slabo kiselim vodenim rastvorima u prisustvu Cd(II) i Pb(II) jona pokazalo je da ovi joni pod datim uslovima ne favorizuju procese autooksidacije ispitivanih jedinjenja jer se UV/Vis spektri ovih rastvora praktično ne menjaju sa vremenom. Na osnovu razlike u izgledu UV/Vis spektara rastvora pirogalola i etil-galata u prisustvu Pb(II) jona i spektara rastvora ovih jedinjenja bez prisustva metalnih jona može se pretpostaviti da Pb(II) jon sa ovim jedinjenjima gradi pod datim uslovima neku vrstu stabilnog kompleksa sa značajnim učešćem kovalentne veze.
- Ispitivanje procesa autooksidacije pirogalola i galne kiseline u slabo baznim vodenim rastvorima u prisustvu Mg(II) jona primenom metode HPLC dalo je rezultate koji su u saglasnosti sa rezultatima spektrofotometrijskih ispitivanja. Kao i kod autooksidacije pirogalola u baznoj sredini bez prisustva metalnih jona i u hromatogramu proizvoda produžene autooksidacije pirogalola u prisustvu Mg(II) jona koji je dobijen HPLC-

DAD tehnikom detektovan je veći broj komponenti u odnosu na hromatogram dobijen primenom HPLC sa fluorescentnom detekcijom što ukazuje da u toku produžene autooksidacije pirogalola u prisustvu Mg(II) jona takođe dolazi do njegove razgradnje.

- ESR spektroskopijom su detektovani slobodni radikali u rastvorima u kojima je vršena autooksidacija pirogalola i galne kiseline u prisustvu Mg(II) jona na pH 8,5 i u rastvoru u kome je vršena autooksidacija pirogalola u prisustvu Zn(II) jona na pH 6,5. Kompjuterskom simulacijom ESR spektara proizvoda autooksidacije pirogalola i galne kiseline u prisustvu Mg(II) jona na pH 8,5 u oba sistema je utvrđeno prisustvo dva stabilna radikala od kojih je jedan spinski stabilisani primarni radikal, a drugi je spinski stabilisan radikal semihinona koji je nastao oksidacijom odgovarajućeg polaznog jedinjenja. U rastvoru u kome je vršena autooksidacija pirogalola u prisustvu Zn(II) jona na pH 6,5 detektovan je samo spinski stabilisan primarni radikal pirogalola. Promena vrednosti konstanti hiperfinog cepanja kod spinski stabilisanih primarnih radikala usled preraspodele elektronske gustine pod uticajem dijamagnetnih M(II) jona u odnosu na vrednosti iz literature za odgovarajuće primarne radikale u vodenim rastvorima bez prisustva dijamagnetnih M(II) jona analogna je kao kod slobodnih radikala dobijenih autooksidacijom vicinalnih dihidroksilnih fenolnih jedinjenja.
- Redosled reaktivnosti vicinalnih trihidroksilnih fenolnih jedinjenja ispitivanih u ovom radu pod istim ili približno istim uslovima uvek je bio pirogalol > etil-galat > galna kiselina. Najveća reaktivnost pirogalola se može objasniti jednostavnijom strukturom molekula, odnosno nepostojanjem drugih supstituenata na benzenovom prstenu osim tri fenolne hidroksilne grupe. Manja reaktivnost galne kiseline u odnosu na etil-galat može se objasniti disocijacijom karboksilne grupe jer je galna kiselina u svim sistemima koji su ispitivani u ovom radu zbog relativno niske vrednosti pK_1 bila najvećim delom u obliku anjona.

Dobijeni rezultati omogućavaju bolje razumevanje mehanizama procesa autooksidacije ispitivanih jedinjenja što je posebno značajno jer se galna kiselina nalazi u mnogim biljkama koje pokazuju izraženo farmakološko delovanje, dok se etil-galat koristi kao antioksidant u prehrambenim proizvodima, a u novije vreme su vršena ispitivanja mogućnosti njegove primene u terapijske svrhe. Osim toga, ovi rezultati se mogu koristiti i za tumačenje antioksidativnog delovanja prirodnih vicinalnih trihidroksilnih fenolnih jedinjenja kao što su

neki flavonoidi i estri galne kiseline koji se mogu naći u mnogim biljnim vrstama koje se koriste u ishrani ili imaju primenu u tradicionalnoj medicini.

6. Summary

In this doctoral dissertation the examination of divalent diamagnetic biometal ions (Mg(II), Ca(II), Sr(II), Ba(II), Zn(II), Cd(II) and Pb(II)) influence on vicinal trihydroxy phenolic compounds autoxidation in aqueous solutions was performed. Autoxidation processes of pyrogallol (the simplest compound with appropriate structure), gallic acid and ethyl gallate were studied with the application of UV/Vis spectrophotometry with chemometric data processing, High-performance liquid chromatography (HPLC), Mass spectrometry (ESI-MS) and ESR spectroscopy.

Based on the obtained results, the following conclusions are derived:

- It has been found that the pH value of the solution and the presence and type of diamagnetic metal ions have a great influence on the investigated compounds autoxidation process rate and mechanism.

- By recording UV/Vis spectra of the studied systems during the autoxidation process spectrophotometric data are obtained which were subsequently processed by chemometric techniques. Graphic matrix analysis was used as a simple test to determine the number of absorbing species in the process of autoxidation. MCR-ALS method was used for detailed analysis of the spectrophotometric data and, in addition to its application for confirmation of the number of absorbing species which were obtained by the graphic matrix method, by means of it the spectra of the individual components occurring in the autoxidation process and their concentration profiles were obtained. Analysis of the UV / Vis spectra of the individual components obtained using MCR-ALS method and their comparison with literature data for similar systems has allowed to draw conclusions about the structure of the investigated compounds autoxidation products.

- Spectrophotometric study of vicinal trihydroxy phenolic compounds autoxidation processes in alkaline aqueous solutions without the presence of metal ions has proved that during autoxidation process products with more complex structures were formed, possibly dimer or a polymer type, since in their UV/Vis spectra obtained by the method of MCR-ALS pronounced absorption at longer wavelengths occurs. Spectrophotometric data also show that the autoxidation process of pyrogallol is carried out by the mechanism which is more complicated in comparison to gallic acid

and ethyl gallate, and in this system purpurogallin, as an intermediate product of the autoxidation, was identified.

- For all three compounds examined in this study the increase of pH value of the solution, even in a small range, resulted in autoxidation process acceleration. In doing so, a pH value increase from 7.4 to 8.0 changed the mechanism of the pyrogallol reaction, while the effect of the acceleration of autoxidation process without changing the mechanism of reactions with increase the pH value of the solution for one unit (from 9.5 to 10.5 with the gallic acid and from 9.0 to 10.0 in ethyl gallate) was considerably more pronounced for ethyl gallate than gallic acid.

- Investigation of autoxidation of pyrogallol and gallic acid in alkaline aqueous solutions in the absence of metal ions using the HPLC method yielded results that were largely consistent with the results of spectrophotometric studies, but additional information were obtained. In the chromatogram of the products of prolonged autoxidation of pyrogallol obtained by HPLC - DAD technique a larger number of components were detected in comparison to the chromatogram obtained by HPLC with fluorescence detection, which indicates that during prolonged autoxidation of pyrogallol its degradation took place. The HPLC-DAD chromatogram of the products of gallic acid autoxidation at pH 10.0 showed not only one (the main) product of autoxidation which corresponds to a kind of gallic acid dimer, considering its retention time and UV/Vis spectrum, but also very low concentration of the compound which corresponds to ellagic acid, considering its retention time and UV/Vis spectrum, for which there are published data that it is formed during autoxidation of gallic acid in strongly alkaline aqueous solutions.

- Investigation of trihydroxy vicinal phenolic compounds autoxidation in alkaline aqueous solutions without the presence of metal ions based on the ESI-MS method has allowed the identification of the products resulting from prolonged autoxidation of these compounds. For all three compounds examined in this study the same degradation products were detected which correspond to the structure of the hydroxy acids formed by breaking the bonds in the benzene ring with the simultaneous reaction of the formed fragments with the ions and free radicals present in the solution.

- Spectrophotometric study of vicinal trihydroxy phenolic compounds autoxidation processes in a weakly alkaline aqueous solutions in the presence of alkaline earth metal ions ((Mg(II) , Ca(II) , Sr(II) , Ba(II)) showed a significant difference in terms of the spectral characteristics of the autoxidation products obtained in the presence of Mg(II) ions as compared to the spectral characteristics of the products obtained in the presence of Ca(II), Sr(II), Ba(II) ions that are very similar. Autoxidation process characteristics of studied compounds (spectra of the individual components and their concentration profiles obtained by the MCR-ALS method) in the presence of Mg(II) ions at pH 7.4 are more similar to autoxidation processes in aqueous solutions without the presence of metal ions at a higher pH than to autoxidation processes in the presence of other alkaline earth metal ions. Such a specific effect of Mg (II) ion can be explained by significantly smaller the ionic radius (in addition to a significantly higher electronegativity and values of the enthalpy of hydration) of this ion in comparison to the other alkaline earth metal ions. The impact of the differences in physico-chemical characteristics of Ca(II) , Sr(II) , and Ba(II) ions to the studied phenolic compounds autoxidation process is manifested by the difference in the rate of the process in the presence of different ions.

- The comparison of concentration profiles of the of absorbing species obtained using MCR-ALS method for pyrogallol autoxidation process at pH 7.4 in the solution without the presence of metal ions, and for pyrogallol autoxidation processes at pH 7.4 in the presence of alkaline earth metal ions revealed that the presence of these ions in solution greatly accelerates pyrogallol autoxidation process.

- Spectrophotometric study of vicinal trihydroxy phenolic compounds autoxidation processes in weakly acidic aqueous solutions in the presence of Zn(II) ions has shown that only in the case of pyrogallol autoxidation took place, while gallic acid and ethyl gallate UV/Vis spectra of the studied system practically did not change with time. UV/Vis spectra of the pyrogallol autoxidation product in the presence of Zn (II) ions at a pH of 5.5 and 6.5 were similar to the pyrogallol autoxidation product spectra in the presence of Ca (II), Sr (II) and Ba (II) ions at pH 7.4.

- Spectrophotometric study of vicinal trihydroxy phenolic compounds autoxidation processes in weakly acidic aqueous solutions in the presence of Cd(II) and Pb(II) ions proved that these ions under the given process conditions do not favor the

autoxidation of studied compounds since UV/Vis spectra of these solutions practically did not change with time. Based on differences in the appearance of UV/Vis spectra between pyrogallol solution and ethyl gallate solution, in the presence of Pb(II) ions and the spectra of these compounds solution in the absence of metal ions, it can be assumed that the Pb(II) ion under given conditions formed some kind of stable complex with studied compounds with a significant participation of the covalent bond.

- Study of pyrogallol and gallic acid autoxidation in weakly alkaline aqueous solutions in the presence of Mg (II) ions with the application of HPLC method gave results that were consistent with the results of spectroscopic studies. As with the autoxidation of pyrogallol in alkaline aqueous solutions without the presence of metal ions, chromatogram for prolonged pyrogallol autoxidation in the presence of Mg(II) ions which was obtained by HPLC-DAD technique detected a larger number of components in comparison to the chromatogram obtained by HPLC with fluorescence detection, indicating that prolonged autoxidation of pyrogallol in the presence of Mg (II) ions also leads to its degradation.

- With ESR spectroscopy free radicals were detected in the solutions in which the autoxidation of pyrogallol and gallic acid in the presence of Mg (II) ions was carried out at pH 8.5 and in a solution in which the autoxidation of pyrogallol in the presence of Zn (II) ions was carried out at pH 6.5. Computer simulation of the ESR spectra of the pyrogallol and gallic acid autoxidation products in the presence of Mg (II) ions at pH 8.5 in both systems determined the presence of two defined stable radicals, one of which is spin-stabilized primary radical, and the other one being a spin-stabilized semiquinone radical formed by the oxidation of corresponding compound. In the solution in which the autoxidation of pyrogallol is carried out in the presence of Zn (II) ions at pH 6.5 only primary spin-stabilized radical of pyrogallol was detected. Changes of the hyperfine splitting constant values of spin-stabilized primary radicals caused by the redistribution of electron density under the influence of diamagnetic M(II) ions in comparison to values from the literature for the corresponding primary radicals in aqueous solutions without the presence of diamagnetic M(II) ions were analogous as for free radicals derived from the autoxidation of vicinal dihydroxy phenolic compounds.

- The order of reactivity of vicinal trihydroxy phenolic compounds examined in this study under the same or similar conditions was always pyrogallol > ethyl gallate > gallic acid. The highest reactivity of pyrogallol can be explained by a simpler structure of the molecule and the absence of substituents on the benzene ring other than three phenolic hydroxyl groups. Gallic acid lower reactivity as compared to the ethyl gallate may be explained by the dissociation of the carboxyl group in gallic acid, because gallic acid was mostly in the form of anion in all the investigated systems in this study due to it's relatively low pK_1value.

The obtained results provide a better understanding of investigated compounds autoxidation process mechanisms which is especially important since ~~the~~ gallic acid is present in many plants having significant pharmacological activity, while ethyl gallate is used as an antioxidant in food and more recently tests about it's possible therapeutic application have been carried out. Furthermore, these results can be used for the interpretation of the antioxidant action of natural vicinal trihydroxy phenolic compounds such as flavonoids, and gallic acid esters, which can be found in many plant species which are used in nutrition or have application in traditional medicine.

7. Literatura

Abrash H.I., Shih D., Woodrow E., Malekmehr F. (1989) A kinetic study of the air oxidation of pyrogallol and purpurogallin. Int. J. Chem. Kinet. **21**:465-476

Acworth I.N.:*The Handbook of Redox Biochemistry*, ESA, Inc., Chelmsford, USA, 2003

Adams M., Blois S. M. Jr., Sands R. H. (1958) Paramagnetic resonance spectra of some semiquinone radicals. J. Chem. Phys. **28**:774-776

Amrhein M., Srinivasan B., Bonvin D., Schumacher M.M. (1996) On the rank deficiency and rank augmentation of the spectral measurement matrix. Chemom. Intell. Lab. Syst. **33**:17-33

Antolovich M., Bedgood JR. D.R, Bishop A.G., Jardine D., D. Prenzler P.D.,Robards K. (2004) LC-MS Investigation of Oxidation Products of Phenolic Antioxidants. J. Agric. Food Chem. **52**:962-971

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.: *Toxicological profile for ATSDR. Toxicological profile for cadmium.* Atlanta, GA. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1999

Back R.A. (1984) The ultraviolet absorption spectrum of oxalic acid vapor. Can. J. Chem. **62**:1414-1428

Barclay L.R.C., Edwards C.E., Vinqvist M.R. (1999) Media effects of antioxidant activities of phenols and catechols. J. Am. Chem. Soc. **121**:6226-6231

Beebe K.R., Pell R.J., Seasholtz M.B.: *Chemometrics: A Practical Guide*, Wiley-Interscience Series on Laboratory Automation, Wiley-VCH, Weinheim, 1998

Beltrán J.L., Sanli N., Fonrodona G., Barrón D., Özkan G., Barbosa J. (2003) Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic pKa values of polyphenolic acids in water and acetonitrile-water media. Anal. Chim. Acta **484**:253-264

Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K.V. (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. Ann. Bot-London **91**(SPEC. ISS. JAN.):179-194

Bors W., Michel C., Stettmaier K. (2000) Electron paramagnetic resonance studies of radical species of proanthocyanidins and gallate esters. Arch. Biochem. Biophys. **374**:347-355

Bravo L. (1998) Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutr. Rev. **56**: 317-333

Brzoska M.M., Moniuszko-Jakoniuk J. (1997) Calcium deficiency as on the risk factors for osteoporosis. Post. Hig. Med. Dosw. **51**:55-74

Burton G.W., Doba T., Gabe E.J., Hughes L., Lee F.L., Prasad L., Ingold K.U. (1985) Autoxidation of biological molecules. 4. Maximizing the antioxidant activity of phenols. J. Am. Chem. Soc. **107**:7053-7065

Carrington A., Smith I.C.P. (1964) An electron spin resonance study of proton transfer equilibria involving the pyrogallolsemiquinone radical. Mol. Phys. **8**:101-105

Choe E., Min D. B. (2005) Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. J. Food Sci.**70**:R142-R159

Choueiri L., SandaChede V.S., Calokerinos A. , Kefalas P. (2012) Antioxidant/pro-oxidant properties of model phenolic compounds. Part II: Studies on mixtures of polyphenols at different molar ratios by chemiluminescence and LC–MS. Food Chem. **133**:1039–1044

Coleman J.S., Varga L.P., Mastin S.H. (1970) Graphical methods for determining the number of species in solution from spectrophotometric data. Inorg. Chem. **9**:1015-1020

Collier P.D. (1966) The Oxidation of purpurogallin by oxygen and hydrogen peroxide. J. Chem. Soc. C 2255-2261

Corradini D., Elena Eksteen E., Eksteen R., Schoenmakers P., Miller N.: *Handbook of HPLC (Chromatographic Science Series)*, CRC Press, 1998

Counis M.F., Torriglia A. (2000) Dnases and apoptosis. Biochem. Cell Biol. **78**:405–414

Crichton R.R.: *Biological Inorganic Chemistry An Introduction*, Elsevier B.V., London, 2008

Di Meo F., Lemaur V., Cornil J., Lazzaroni R., Duroux J.-L., Olivier Y., Trouillas P. (2013) Free radical scavenging by natural polyphenols: Atom versus electron transfer. J. Phys. Chem. A **117**:2082-2092

Eaton D.R. (1964) Complexing of metal ions with semiquinones. An electron spin resonance study. Inorg. Chem. **3**:1268-1271

Eslami A. C., Pasanphan W., Wagner B. A., Buettner G. R. (2010) Free radicals produced by the oxidation of gallic acid: An electron paramagnetic resonance study. Chem. Cent. J. **4**:15

Felix C.C., Sealy R.C. (1982) o-benzosemiquinone and its metal chelates. Electron spin resonance investigation of radicals from the photolysis of catechol in the presence of complexing metal ions. J. Am. Chem. Soc. **104**:1555-1560

Fernández C., Callao M.P., Larrechi M.S. (2011) Kinetic analysis of C.I. Acid Yellow 9 photooxidativedecolorization by UV-visible and chemometrics. J. Hazard. Mater. **190**:986-992

Friedman M., Jurgens H.S. (2000) Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. J. Agric. Food Chem. **48**:2101-2110

Gampp H., Meader M., Meyer C.J, Zuberbuehler A.D. (1987) Quantification of a Known Component in an Unknown Mixture. Anal. Chim. Acta **193**:287-293

Gao R., Yuan Z., Zhao Z., Gao X. (1998) Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. Bioelectroch. Bioener. **45**:41-45

Garrido M., Ruis F.X., Larrechi M.S. (2008) Multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) applied to spectroscopic data from monitoring chemical reactions processes. Anal.Bioanal. Chem. **390**:2059-2066

Giinzler H., Williams A.: *Handbook of Analytical Techniques*,Wiley-VCH, Weinheim, 2001

Gil M.I., Tomas-Barberan F.A., Hess-Pierce B., Holcroft D.M., Kader A.A. (2000) Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. J. Agric. Food Chem. **48**:4581-4589

Golub G.H., Van Loan C.F.: *Matrix Computations, 2nd edition*, The John Hopkins University Press, London, 1989

Gotes J., Kasian K., Jacobs H., Cheng Z.-Q., Mink S.N. (2012) Benefits of ethyl gallate versus norepinephrine in the treatment of cardiovascular collapse in Pseudomonas aeruginosa septic shock in dogs. Crit. Care Med. **40**:560-572

Goyer R.A., Clasen C.D.: *Metal Toxicology*, Academic Press, San Diego, 1995

Gupta Y.K., Sharma M., Chaudhary G. (2002) Pyrogallol-induced hepatotoxicity in rats: A model to evaluate antioxidant hepatoprotective agents. Method. Find. Exp. Clin. **24**:497-500

Guresir M., N. Aktas, A. Tanyolac (2005) Influence of reaction conditions on the rate of enzymic polymerization of pyrogallol using laccase. Process. Biochem. **40**:1175-1182

Halliwell B. (1990) How to characterize a biological antioxidant. Free Rad. Res. Com. **9**:1-32

Halliwell B., Gutteridge J. M. C.: *Free radicals in biology and medicine. 3rd ed*. Oxford Univ. Press, New York, 2007

He Z., Xia W. (2007) Analysis of phenolic compounds in Chinese olive (Canarium album L.) fruit by RP HPLC DAD-ESI-MS. Food Chem. **105**:1307-1311.

Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002) Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. J. Nutr. Biochem. **13**:572-584.

Hu Y. Z., Jiang LJ. (1996) Generation of semiquinone radical anion and reactive oxygen ($^1O_2$, O^{2-}, and ·OH) during thephotosensitization of a water-soluble perylenequinone derivative. J. Photoch.Photobio. **33**:51-59

Inoue M, Sakaguchi N, Isuzugawa K, Tani H, Ogihara Y. (2000) Role of reactive oxygen species in gallic acid – induced apoptosis. Biol. Pharm. Bull. **23**:1153-1157

Jacobien K., Von Frijatag D.K., Van der Zee J., Ljzerman A.P. (1996) Radical scavenging properties of adenoside and derivatives in vitro. Drug Develop. Res. **37**:48-54

Jaumot J., Gargallo R., Juan A.D., Tauler R. (2005) A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: A new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. Chemometr.Intell. Lab. **76**:101-110

Jovanovic J.M., Nikolic R.S., Kocic G.M., Krstic N.S., Krsmanovic M.M. (2013) Glutathione protects liver and kidney tissue from cadmium- and lead-provoked lipid peroxidation. J. Serb. Chem. Soc. **78**:197-207

Kahkonen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J., Rauha J.P., Pihlaja K., Kujala T.S., Heinonen M. (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. J. Agric. Food Chem. **47**:3954 -3962

Kalyanaraman B. (1990). Characterization of *o*-semiquinone radicals in biological systems. Method. Enzymol. **186**:333-343

Kalyanaraman B., Sealy R.C., Sivarajah K (1984) An electron spin resonance study of o-semiquinones formed during the enzymatic and autoxidation of catechol estrogens. J. Biol. Chem. **259**:14018-14022

Kamau P., Jordan R.B. (2002) Kinetic study of the oxidation of catechol by aqueous copper(II). Inorg. Chem. **41**:3076-3083

Karbowiak T., Gougeon R. D., Alinc J.B., Brachains L. (2010) Wine Oxidation and the Role of Cork, Crit. Rev. Food Sci. **50**:20-52

Kazakevich Z., Lobrutto R.: *HPLC for Pharmaceutical Scintists*, John Wiley&Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2007

Kim H-s, Chung T.D., Kim H. (2001) Voltammetric determination of the pKa of various acids in polar aprotic solvents using 1,4-benzoquinone. J. Electroanal. Chem. **498**:209–215.

Kim W.-H., Song H.-O., Choi H.-J., Bang H.-I., Choi D.-Y., Park H. (2012) Ethyl gallate induces apoptosis of HL-60 cells by promoting the expression of caspases-8, -9, -3, apoptosis-inducing factor and endonuclease G. Int. J. Mol. Sci. **13**:11912-11922

Kinniburgh D.G, van Riemsdijk W.H, Koopal L.K, Borkovec M., Benedetti M.F., Avena M.J. (1999) Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency. Colloid. Surface. A **151**: 147–166.

Knekt P., Kumpulainen J., Järvinen R., Rissanen H., Heliövaara M., Reunanen A., Hakulinen T., Aromaa A. (2002) Flavonoid intake and risk of chronic diseases. Am. J. Clin. Nutr. **76**:560-568

Kobata-Pendias A., Mukherjee A.B.: *Trace elements from soil to human*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2007

Lebedev A.V., Ivanova M.V., Ruuge E.K. (2011) Calcium-dioxolene complexes: rate constants of pyrocatechol oxidation in the presence of Ca2+. Biofizika **56**:205-211

Lebedev A.V., Ivanova M.V., Timoshin A.A., Ruuge E.K. (2007) Effect of group II metal cations on catecholate oxidation. ChemPhysChem **8**:1863-1869

Lebedev A.V., Ivanovo M.V., Timoshin A.A., Ruuge, E.K. (2008) Effect of calcium cations on acid-base properties and free radical oxi- dation of dopamine and pyrocatechol. Biomeditsinskaya Khimiya **54**:687-695

Lee M.S.: *Mass Spectrometry Handbook*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2012

Leucuta S., Vlase L., Gocan S., Radu L., Fodorea C. (2005) Determination of phenolic compounds from Geranium sanguineum by HPLC. J. Liq. Chromatogr. RT **28**:3109-3117

Lund Myhre C.E., Nielsen C.J. (2004) Optical properties in the UV and visible spectral region of organic acids relevant to tropospheric aerosols. Atmos. Chem. Phys. **4**:1759-1769

Mehla K., Balwani S., Kulshreshtha A., Nandi D., Jaisankar P., Ghosh B. (2011) Ethyl gallate isolated from Pistacia integerrima Linn. inhibits cell adhesion molecules by blocking AP-1 transcription factor. J. Ethnopharmacol. **137**:1345-1352

Melo R.P., Leal J. P., Takács E., Wojnárovits L. (2009) Radiolytic degradation of gallic acid and its derivatives in aqueous solution. J. Hazard. Mater. **172**:1185-1192

Meloun M., Čapek J., Syrový T. (2005) Number of species in complexationequilibria of SNAZOXS or Naphtylazoxine 6S and Cd2+, Co2+, Cu2+, Ni2+, Pb2+ and Zn2+ ions by PCA of UV-vis spectra. Talanta **66**:547-561

Meloun M., Syrový T., Vrána A. (2003) Determination of the number of light-absorbing species in the protonation equilibra of selected drugs. Anal. Chim. Acta **489**:137-151

Merken H.M., Beecher G.R. (2000) Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. J. Agr. Food Chem. **48**:577-599

Milić B. Lj., Djilas S. M, Čanadanović-Brunet J. M. (1998) Antioxidative activity of phenolic compounds on the metal-ion breakdown of lipid peroxidation system. Food Chem. **61**:443-447

Miyazaki K., Arai S., Iwamato T., Takasaki M., Tomoda A. (2004) Metabolism of pyrogallol to purpurogallin by human erythrocytic hemoglobin. Tohuku J. Exp. Med. **203**:319-330

Mouhajir F., Pedersen J. A., Rejdali M., Towers G. H. N. (2001) Phenolics in Maroccan medicinal plant species as studied by electron spin resonance spectroscopy. Pharm. Bio. **39**:391-398

Moura F.C., Araujo M.H., Dalmázio I., Alves T.M., Santos L.S., Eberlin M.N., Augusti R., Lago R.M. (2006) Investigation of reaction mechanisms by electrospray ionization mass spectrometry: characterization of intermediates in the degradation of phenol by a novel iron/magnetite/hydrogen peroxide heterogeneous oxidation system. Rapid Commun. Mass Spectrom. **20**:1859-63.

Navea S., Juan A.D., Tauler R. (2001) Three-way data analysis applied to multispectroscopic monitoring of protein folding. Anal. Chim. Acta **446**:185-197

Nia Y., Liub Q., Kokot S. (2011) Spectrophotometric study of the interaction between chlorotetracycline and bovine serum albumin using Eosin Y as site marker with the aid of chemometrics. Spectrochim. Acta. A **78**:443-448

Nicolis E., Lampronti I., Dechecchi M.C., Borgatti M., Tamanini A., Bianchi N., Bezzerri V., Mancini I., Giri M.G., Rizzotti P., Gambari R., Cabrini G. (2008) Pyrogallol, an active compound from the medicinal plant Emblicaofficinalis, regulates expression of pro-inflammatory genes in bronchial epithelial cells. Int. Immunopharmacol. **8**:1672-1680

Nijveldt R.J., Van Nood E., Van Hoorn D.E.C., Boelens P.G., Van Norren K., Van Leeuwen P.A.M. (2001) Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. Am. J. Clin. Nutr. **74**:418-425

Nikolić G., Veselinović A., Mitić Ž., Živanović S. (2011a) HPLC-DAD Study of Gallic Acid Autoxidation in Alkaline Aqueous Solutions and the Influence of Mg(II) Ion. Acta Fac. Med. Naiss. **28**:219-224

Nikolić G.M., Nikolić R.S., Milić B.Lj., Čanadanović-Brunet J.M. (1998b) Primena metode elektronske spinske rezonance za proučavanje antioksidantnih svojstava prirodnih fenolnih jedinjenja. Acta Fac. Med. Naiss. **15**:183-188.

Nikolić G.M., Premović P.I., Nikolić R.S. (1998a) Spectrophotometric study of catechol oxidation by aerial O_2 in alkaline aqueous solutions containing Mg(II) ions. Spectrosc. Lett. **31**:327-333

Nikolić G.M., Veselinović A.M., Nikolić R.S., Mitić S.S. (2011b) Spectroscopic Study of Mg(II) Ion Influence on the Autoxidation of Gallic Acid in Weakly Alkaline Aqueous Solutions. Russ. J. Phys. Chem. A **85**:2270-2273

Nikolić G.M., Veselinović A.M., Nikolić R.S., Mitic Ž.J., Živkovic J.V. in Proceedings of the 10th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry (Belgrade, Serbia, 2010), p. 188

Nikolić R.S., Jovanović J.M., Kocić G.M., Cetković T.P., Stojanović S.R., Anđelković T.D., Krstić N.S., (2011) Praćenjeefekataizloženostiolovu i kadmijumu u radnoj i životnoj sredini preko parametara standardne biohemijske analize krvi i aktivnosti endonukleaza jetre. Hem. Ind. **65**:403-409

Nikolić R.S., Krstić N.S.,Jovanović J.M., Kocić G.M., P. Cvetković T.P., Radosavljević-Stevanović N. (2013) Monitoring the toxic effects of Pb, Cd and Cu on hematological parameters of Wistar rats and potential protective role of lipoic acid and glutathione. Toxicol. Ind. Health. January 4, 1-8 doi: 10.1177/074823371246965

Nogaki A., Satoh K., Iwasaka K., Takano H., Takahama M., Ida Y., Sakagami H. (1998) Radical intensity and cytotoxic activity of curcumin and gallic acid. Anticancer Res. **18**:3487-3491

Nordberg G.F., Fowler B.A., Nordberg M.,Friberg L.T.: *The Handbook on the Toxicology of Metals*, Elsevier Inc, London, 2007

Ohara Z., Peterson T. E., Harrison D. G. (1993) Hypercholesterolemia Increases Endothelial Superoxide Anion Production. J. Clin. Invest. **91**:2546-2551

Oniki T. and Takahama U. (2004) Free radicals produced by the oxidation of gallic acid and catechin derivatives. J. Wood Sci. **50**:545-547

Park W.H., Han Y.H., Kim S.H., Kim S.Z. (2007) Pyrogallol, ROS generator inhibits As4.1 juxtaglomerular cells via cell cycle arrest of G2 phase and apoptosis. Toxicology **235**:130-139

Pasanphan W., Buettner G. R., Chirachanchai S. (2010) Chitosan gallate as a novel potential polysaccharide antioxidant: an EPR study. Carbohyd. Res. **345**:132-140

Perkampus H-H.: *UV-VIS spectroscopy and its applications*, Springer-Verlag, New York Inc., 1992

Perron N. R., García C. R., Pinzón J. R., Chaur M. N., Brumaghim J. L. (2011) Antioxidant and prooxidant effects of polyphenol compounds on copper-mediated DNA damage. J. Inorg. Biochem. **105**:745-753

Pyrogallol, in: S. Budavari (Ed.), The Merck Index, 12th ed., Merck & Co. Inc., Whitehall, NJ, 1996, 1375–1376

Ren W.Y., Qiao Z.H., Wang H.W., Zhu L., Zhang L. (2003) Flavonoids: Promising anticancer agents. Med. Res. Rev. **23**:519-534

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Bio. Med. **20**:933-956

Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci. **2**:152-159.

Rieger P.H.: *Electron Spin Resonance Analysis and Interpretation*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2007

Roginsky V., Alegria A.E. (2005) Oxidation of tea extracts and tea catechins by molecular oxygen. J. Agr. Food Chem. **53**:4529-4535

Saeki K., Hayakawa S., Isemura M., Miyase T. (2000) Importance of a pyrogallol-type structure in catechin compounds for apoptosis-inducing activity. Phytochemistry **53**:391-394

Sakagami H. and Satoh K. (1996) The interaction between two antioxidants, sodium ascorbate and gallic acid: radical intensity and apoptosis induction. Anticancer Res. **16**:1231-1234

Sakagami H., Satoh K., Hatano T., Yoshida T., Okuda T. (1997) Possible role of radical intensity and oxidation potential for gallic acid-induced apoptosis. Anticancer Res. **17**:377-380

Sakaguchi N., Inoue M., Ogihara Y. (1998) Reactive oxygen species and intracellular Ca2+, common signals for apoptosis induced by gallic acid. Biochem. Pharm. **55**:1973-1981

Salem I. A., El-Mazawi M., Zaki A. B. (2000) Kinetics and mechanisms of decomposition reaction of hydrogen peroxide in presence of metal complexes. Int. J. Chem. Kinet. **32**:643-666

Sanchez F.C., Toft J., van den Bogaert B., Massart D.L. (1996) Orthogonal projection approach applied to peak purity assessment. Anal. Chem. **68**:79-85

Sanz M., Fernández de Simón B., Esteruelas E., Ma Munoz A., Cadahía E., Hernández M.T., Estrella I., Martinez J. (2012) Polyphenols in red wine aged in acacia (Robiniapseudoacacia) and oak (Quercuspetraea) wood barrels. Anal. Chim. Acta **732**:83–90

Sarkar S., Yadav P., Trivedi R., Bansal A.K., Bhatnagar D. (1995) Cadmium induced lipid peroxidation and status of antioxidant system in rats' tissues. J. Trace Elem. Med. Biol. **9**:144-149

Scalbert A., Manach C., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2005) Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Crit. Rev. Food Sci. **45**:287-306

Schüsler-Van Hees M.T.I.W., Beijersbergen Van Henegouwen G.M.J., Stoutenberg P. (1985) Autoxidation of catechol(amine)s. Pharm. Weekblad. **7**:245-251

Serrano A., Papacios C., Roy G., Cespon C., Villar M.L., Nocito M., Gonzalez-Porque P. (1998) Derivatives of gallic acid induce apoptosis in tumoral cell lines and inhibit lymphocyte proliferation. Arch. Biochem. Biophys. **350**: 49-54

Severino J.F., Goodman B. A., Kay C. W. M., Stolze K., Tunega D., Reichenauer T. G., Pirker K. F. (2009) Free radicals generated during oxidation of green tea polyphenols: Electron paramagnetic resonance spectroscopy combined with density functional theory calculations. Free Radical Bio. Med. **46**:1076-1088

Severino J.F., Goodman B. A., Reichenauer T.G., Pirker K.F. (2011) Is there a redox reaction between Cu(II) and gallic acid? Free Radical Res. **45**:115-124.

Shi H., Noguchi N., Niki E., Introducing natural antioxidants, in: *Antioxidants in food, Practical applications*, Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M., Woodhead Publishing Limited, EDS., Cambridge, England, 2001, 22-70

Smith I.C.P., Carrington A. (1967) An electron spin resonance study of proton transfer equilibria involving the semiquinone radicals derived from hydroquinone and catechol, Mol. Phys. **12**:439-448

Spasojević I., Mojović M., Ignjatović A., Bačić G. (2011) The role of EPR spectroscopy in the studies of the oxidative status of biological systems and the antioxidative properties of various compounds. J. Serb. Chem. Soc. **76**:647-677

Syed I.B., Hosain F. (1972) Determination of LD50 of barium chloride and allied agents. Toxicol. Appl. Pharm. **22**:150–152

Tauber H. (1953) Oxidation of pyrogallol to purpurogallin by crystallin catalase. J. Biol. Chem. **205**:395- 400

Tauler R. (1995) Multivariate curve resolution applied to second order data. Chemom.Intell. Lab. Syst. **30**:133-146

Tulyathan V., Boulton R.B., Singleton V.J. (1989) Oxygen uptake by gallic acid as a model for similar reactions in wines. J. Agric. Food Chem. **37**:844-849

Upadhyay G., Gupta S.P., Prakash O., Singh M.P. (2010) Pyrogallol-mediated toxicity and natural antioxidants: Triumphs and pitfalls of preclinical findings and their translational limitations. Chem-biol. Interact. **183**:333-340

van Acker S. A. B. E., de Groot M. J., van den Berg D-J., Tromp M. N. J. L., den Kelder G. D-O., van der Vijgh W. J. F., and Bast A. (1996) A quantum chemical explanation of the antioxidant activity of flavonoids. Chem. Res. Toxicol. **9**:1305-1312

Veselinović A.M., Bojić A.Lj., Purenović M.M., Nikolić G.M., Anđelković T.D., Dačić S.D., Bojić, D.V. (2010) Ispitivanje uticaja parametara UV/H2O2 procesa na degradaciju huminskih kiselina. Hem. Ind. **64**:265-273

Veselinović A.M., Nikolić R.S., Nikolić G.M. (2012) Application of multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) for resolving pyrogallol autoxidation in weakly alkaline aqueous solutions. Cent. Eur. J. Chem. **10**:1942-1948

Videla L.A., Fernandez V., Tapia G., Varela P. (2003) Oxidative stress-mediated hepatotoxicity of iron and copper: role of Kupffer cells. Biometals **16**:103-111

Waalkes M.P. (2000) Cadmium carcinogenesis in review. J. Inorg. Biochem.**79**:241-244

Wentz P.W.: *Chelation Therapy: Conventional Treatments*, Burlington, NC: Advance for Administrators of the Laboratory, Lab. Corp. 2000

Windig W., Guliment J. (1991) Interactive self-modeling mixture analysis. Anal. Chem. **63**:1425-1432

www.fnic.nal.usda.gov

Yamada J., Yoshimura S., Yamakawa H., Sawada M., Nakagawa M., Hara S., Kaku Y., Iwama T., Naganawa T., Banno Y., Nakashima S., Sakai N. (2003) Cell permeable ROS scavengers, Tiron and Tempol, rescue PC12 cell death caused by pyrogallol or hypoxia/reoxygenation. Neurosci. Res. **45**:1-8

Yang C.S., Landau J.M., Huang M.-T., Newmark H.L. (2001) Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. Annu. Rev. Nutr. **21**:381-406

Yilmaz Y., Toledo R.T. (2004) Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins: Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin, and Gallic Acid. J. Agr. Food Chem. **52**:255-260

Yoshioka H., Ohashi Y., Fukuda H., Senba Y., Yoshioka H. (2003) Spectral simulation of the ESR spectra of polyphenol radicals formed by reaction with hydoxyl radical. J. Phys. Chem. A **107**:1127-1132

Yu C., Yongijan W., Jian W., Chan S., Ao Y. (2011) Antioxidant activity studies using electron paramagnetic resonance methods. Prog. Chem. **23**:1959-1972. (in Chinese)

Biografija sa bibliografijom

Biografija

Aleksandar Veselinović rođen je 07.12.1978. godine u Nišu. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Nišu, Odsek Hemija, smer diplomirani hemičar, upisao je školske 1997/1998 godine. Diplomirao je 2002. godine sa prosečnom ocenom 9,46. Za vreme osnovnih studija bio je stipendista Ministarstva za prosvetu: Fondacija za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka Republike Srbije. Na Prirodno-matematičkom fakultetu, Odsek Hemija, Univerzitet u Nišu, 2009. godine je odbranio magistarsku tezu pod nazavom "Fotoliza huminskih kiselina u vodenoj sredini" i stekao akademsko zvanje *magistar hemijskih nauka*. Za vreme postdiplomskih studija bio je stipendista Ministarstva za nauku i tehnologiju. Od 2002 - 2008. bio je stipendista Srpske Akademije nauka i umetnosti: Fondacija za studije nauka i umetnosti. Doktorske studije hemije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu upisao je školske 2009./2010. godine.

Aleksandar Veselinović je kao istraživač angažovan na projektima koji su finansirani od strane Ministrastva prosvete i nauke Republike Srbije: od 2011. projekat „Dobijanje, fizičko-hemijska karakterizacija, analitika i biološka aktivnost farmakološki aktivnih supstanci” br. OI172044 i projekat „Proizvodnja novih dijetetskih mlečnih proizvoda za rizične populacije zasnovana na kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi biohemijskih markera zdravstvenog rizika konzumiranja mleka” br. TR31060.

Od 2008. godine Aleksandar Veselinović radi na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu gde je najpre biran u zvanje saradnika na Katedri Hemija. 2010. godine je izabran, a 2013. godine reizabran u zvanje asistenta na istoj katedri. Angažovan je u izvođenju praktične nastave na predmetima Fizička hemija i Instrumentalne metode hemijske analize.

Bibliografija

M13 – Poglavlje u monografiji

1. Nikolić G.M., Veselinović A.M., Nikolić R.S.: Application of Spectroscopic Techniques for the Study of Gallic Acid Autoxidation. in: *Handbook on Gallic Acid: Natural Occurrences, Antioxidant Properties and Health Implications*, Nova Science Pub. Inc., Hauppauge NY, USA, 2013; 287-299.

M21 – Rad u vrhunskom naučnom časopisu

1. Veselinović J.B., Veselinović A.M., Vitnik Ž.J., Vitnik V.D., Nikolić G.M. Antioxidant properties of selected 4-phenyl hydroxycoumarins: Integrated in vitro and computational studies. *Chemico-Biological Interactions* 2014; 214(1):49-56.
2. Toropova A.P., Toropov A.A., Veselinović J.B., Miljković F.N., Veselinović, A.M. QSAR models for HEPT derivates as NNRTI inhibitors based on Monte Carlo method. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 77:298-305.
3. Veselinović A.M., Milosavljević J.B., Toropov A.A., Nikolić G.M. SMILES-based QSAR model for arylpiperazines as high-affinity 5-HT1A receptor ligands using CORAL. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2013; 48(3):532-541.

M22 – Rad u istaknutom naučnom časopisu

1. Veselinović A.M., Milosavljević J.B., Toropov A.A., Nikolić G.M. SMILES-Based QSAR Models for the Calcium Channel-Antagonistic Effect of 1,4-Dihydropyridines. *Archiv der Pharmazie* 2013; 346(2):134-139.

M23 – Rad u naučnom časopisu

1. Veselinović A.M., Nikolić R.S., Nikolić G.M. Application of multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) for resolving pyrogallol autoxidation in weakly alkaline aqueous solutions. *Central European Journal of Chemistry* 2012; 10(6):1942-1948.
2. Nikolić GM, Veselinović AM, Nikolić RS, Mitić SS. Spectroscopic Study of Mg(II) Ion influence on the Autoxidation of Gallic Acid in Weakly Alkaline Aqueous Solutions. *Russian Journal of Physical Chemistry A* 2011; 85 (13):2270-2273.

3. Veselinović A.M., Bojić A.Lj., Purenović M.M., Nikolić G.M., Anđelković T.D., Dačić S.D., Bojić D.V. Ispitivanje uticaja parametara UV/H_2O_2 procesa na degradaciju huminskih kiselina. *Hemijska industrija* 2010; 64(4):265-273.
4. Dačić S., Dačić-Simonović D., Živković S., Radičević G., Mitić A., Stanojević I., Veselinović A. CEM analiza kvaliteta ivičnog pripoja kompozitnih ispuna za gleđ posle primene totalno nagrizajućeg i samonagrizujućeg adhezivnog sistema. *Srpski Arhiv za Celokupno Lekarstvo* 2009; 137(9-10):475-481.

M52 – Rad u časopisu nacionalnog značaja

1. Goran Nikolić, Aleksandar Veselinović, Žarko Mitić, Slavoljub Živanović. HPLC-DAD Study of Gallic Acid Autoxidation in Alkaline Aqueous Solutions and the Influence of Mg(II) Ion. *Acta Facultatis Medicae Naissensis* 2011; 28(4):219-224.

M33 – Saopšenja sa međunarodnog skupa štampana u celini

1. G.M. Nikolić, A.M. Veselinović, Ž.J.Mitić, and F.S. Miljković. (2012) Application of multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) method for the study of Cu(II) ion influence on pyrogallol autoxidation in aqueous solution. *Proceedings of the 11th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Belgrade, Serbia, p. 188.
2. Ž. Mitić, M. Cakić, G. M. Nikolić, A. Veselinović, Lj. Ilić. (2012) Cobalt(II)-reduced dextran complexes characterization by electronic spectroscopy. *Proceedings of the 10th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Belgrade, Serbia, p. 695.
3. G.M. Nikolić, J.V. Živković, A.M. Veselinović, D. Atanasković, D. Vlajin. (2011) Salting-Out Effects in the Ether Extraction of Paracetamol. *Macedonian Pharmaceutical Bulliten*, 57 (suppl), p. 41-42
4. G.M. Nikolić, A.M. Veselinović, R.S. Nikolić, Ž.J. Mitić, and J.V. Živković. (2010) Spectrophotometric Study of Gallic Acid Autoxidation in Alkaline Aqueous Solutions. *Proceedings of the 10th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry*, Belgrade, Serbia, p. 188.
5. G.M. Nikolić, Ž. Mitić, M. Cakić, R. Nikolić, Lj. Ilić, R. Pavlović, A. Veselinović (2010) Characterization of Cu(II) complexes with reduced dextran derivates by the computer simulation of EPR spectra. *Proceedings of the 10th International*

Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, Serbia, p. 644.

M33 – Saopšenja sa međunarodnog skupa štampana u izvodu

1. Aleksandar Veselinovic, Jovana Milosavljevic, Andrey Toropov. (2012) CORAL: quantitative structure–activity relationship models for estimating reactivation of sarin inhibited acetlycholinesterase by oximes. *19th EuroQSAR Knowledge Enabled Ligand Design*, Vienna, Austria, p. 102.
2. Veselinović AM, Živković JV, Mitić ŽJ, Nikolić RS, Nikolić GM. (2012) Spectrophotometric study of ethyl gallate autoxidation in alkaline aqueus solutions with the application of multivariate curve resolution - alternating least square method. *19thBalkan Medical Week.* Nis, Serbia, 078.
3. Živković J, Veselinović AM, Nikolić GM, Mujić I. (2012) *Castenea sativa mill.* leaf extract as a potential source of antioxidant and antimicrobial agents. *19thBalkan Medical Week.* Nis, Serbia, P74.
4. G.M. Nikolić, A.M. Veselinović, J.V. Živković, R.S. Nikolić. (2010) Relation Between Solubility and Partitioning of Paracetamol for Various Organic Solvents. *14th International Symposium on Solubility Phenomena*, Leoben, Austria, p. 88
5. Veselinović A., Bojić A., Purenović M., Bojić D., Anđelković T. (2009) Fotodegradacija huminskih kiselina u prisustvu vodonik-peroksida. *8th Symposium "Novel Technologies and Economical Development",* Leskovac, Serbia, 23-24 October, Book of Apstracts, 110.
6. Bojić A., Purenović M., Perović J., Anđelković T., Bojić D., Veselinović A., Vodeničarski M. (2005) Photocatalytic degradation of humic acids in water by UV light. *The Sixth European Meeting on Environmental Chemistry*, Belgrade, Serbia and Montenegro, 6-10 December, Book of Abstracts, 209.

Прилог 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

Утицај дијамагнетних двовалентних јона метала на аутооксидацију вициналних трихидроксилних фенолних једињења у воденим растворима

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни у целини, ни у деловима, није била предложена за добијање било које дипломе, према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

У Нишу, 15.05.2014

Аутор дисертације:

Александар М. Веселиновић

Потпис докторанда:

А. Веселиновић

Прилог 2.

ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Име и презиме аутора:
Александар М. Веселиновић

Студијски програм: Хемија

Наслов рада: Утицај дијамагнетних двовалентних јона метала на аутооксидацију вициналних трихидроксилних фенолних једињења у воденим растворима

Ментор: Горан М. Николић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао/ла за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 15.05.2014.

Аутор дисертације:

Александар М. Веселиновић

Потпис докторанда:

А. Веселиновић

Прилог 3.

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла" да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом: Утицај дијамагнетних двовалентних јона метала на аутооксидацију вициналних трихидроксилних фенолних једињења у воденим растворима

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство – некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; кратак опис лиценци је у наставку текста).

У Нишу, 15.05.2014.

Аутор дисертације:

Александар М. Веселиновић

Потпис докторанда:

А. Веселиновић